Успехи биологической химии, т. 53, 2013, с. 297-322

НЕКАТАЛИТИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДСВЯЗЫВАЮЩИЕ ЦЕНТРЫ: СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АТР-СИНТАЗ

©2013 г.

А. Н. МАЛЬЯН

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская область

 Введение. II. Структура и принципы функционирования ATP-синтаз. III. Структура и свойства некаталитических центров F₁-ATPa3. IV. Свойства некаталитичесих центров ATP-синтаз. V. Механизмы участия некаталитических центров в регуляции активности ATP-синтаз. VI. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

В хлоропластах, митохондриях и бактериях конечный этап преобразования энергии осуществляется специализированным полипептидным комплексом АТР-синтазой (F₆F₁-АТРазой) путем сопряжения трансмембранного переноса протонов (ионов натрия) с фосфорилированием аденозиндифосфата. Необходимость адаптации энергетического аппарата к изменяющимся условиям определила появление в ходе эволюции встроенных в комплекс генетически запрограммированных регуляторных механизмов, осуществляющих модуляцию его каталитической активности. Для изучения принципов функционирования этих механизмов крайне важным является знание молекулярной структуры АТР-синтаз. В настоящее время наибольший прогресс достигнут в исследованиях структуры митохондриальной и бактериальных АТР-синтаз [1-5]. Успехи в изучении структуры АТР-синтаз хлоропластов значительно скромнее, что объясняется в первую очередь трудностями их кристаллизации [6]. Положение облегчается тем, что АТР-синтазные комплексы различного биологического происхождения имеют одинаковый минимальный состав субъединиц с достаточно высокой степенью гомологии, что определяет сходство основных принципов их функционирования.

Принятые сокращения: AMP-PNP – 5'-аденилил-β,γ-имидодифосфат, FSBA – 5'-*p*-фторсульфонилбензоиладенозин.

Адрес для корреспонденции: A_Malyan@issp.serpukhov.su; alexander.malyan@ gmail.com.

А.П.МИЛЬЯН	А.Н.Мал	ьян
------------	---------	-----

Общим свойством АТР-синтаз является их обратимая инактивация при падении трансмембранной разности электрохимических потенциалов протонов (энергозависимая регуляция). Считается, что инактивация предохраняет от непроизводительного гидролиза запас АТР, синтезированного в условиях достаточного притока энергии. В рамках этого типа регуляции реализуются как общие, так и специфические механизмы для того или иного вида органелл. К общему механизму следует отнести нуклеотид-зависимую регуляцию АТРазной активности АТР-синтаз. Специфические механизмы регуляции различаются участием є-субъединицы (хлоропласты, бактерии), IF₁-субъединицы (митохондрии), их чувствительностью к АТР. В хлоропластах имеет место специфический механизм регуляции, зависящий от окислительно-восстановительного потенциала стромы и реализующийся через окислительно-восстановительное взаимодействие эндогенного тиоредоксина с дисульфидной связью γ-субъединицы фермента (тиол-зависимая регуляция). Более подробно с указанными механизмами регуляции АТР-синтаз можно ознакомиться в работах [6–9]. АТР-синтазы содержат 3 каталитических и 3 так называемых «некаталитических» нуклеотидсвязывающих центра. Название последних обусловлено крайне низкой, несовместимой с катализом, скоростью обмена связанных на этих центрах нуклеотидов со средой [10], в связи с чем некаталитические центры долгое время не привлекали внимание исследователей. Систематическое изучение их свойств началось лишь с работ Бойера с сотр. (P.D. Boyer) в 1987 г. [11], и к настоящему времени накоплен значительный экспериментальный материал. Публикуемый обзор посвящен описанию, обобщению и анализу данных о свойствах «некаталитических» нуклеотидсвязывающих центров и предполагаемых механизмах их участия в нуклеотидзависимой регуляции АТР-синтаз.

II. СТРУКТУРА И ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АТР-СИНТАЗ

АТР-синтазы хлоропластов, митохондрий и бактерий относится к типу F_0F_1 -АТРаз и состоят из водорастворимой периферической (F_1) и мембранной (F_0) частей. В состав F_1 входят чередующиеся 3α и 3β субъединицы, расположенные вокруг двойной спирали γ субъединицы, а также 1 δ и 1 ϵ субъединица (рис. 1). Состав и количество субъединиц мембранной части, в зависимости от биологического происхождения органелл, более вариабелен. Количество субъединиц *с* варьирует от 8 (АТР-синтазы митохондрий животных) до 15 (сине-зеленая бактерия *Spirulina platensis*) [12, 13]. В состав АТР-синтазы хлоропластов





Рис. 1. Модель FoF1-АТРазы.

входит по 1 субъединице I, II, IV и 14 субъединиц III ([14, 15]. Этим субъединицам соответствуют субъединицы *a*, *b*, *b'* и *c* бактериальных ATP-синтаз. На границах раздела α - и β -субъединиц расположены 3 каталитических и 3 «некаталитических» центра. Некаталитические центры формируются в основном аминокислотными остатками α -субъединицы, а каталитические – β -субъединицы [11, 16].

Преобразование энергии в процессе синтеза АТР происходит в два этапа. Первый этап включает перенос протонов через мембрану, осуществляемый гидрофобной частью АТР-синтазного комплекса, F_0 . На этом этапе трансмембранная разность электрохимических потенциалов протонов преобразуется в механическую энергию вращения «ротора» – блока *с*-субъединиц и связанных с ним γ - и ε -субъединиц [17, 18]. Вращение «ротора» относительно неподвижного статора, включающего $\alpha_3\beta_3\delta abb'$ –субъединицы, вызывается последовательным протонированием-депротонированием консервативной карбоксильной группы каждой из *с*-субъединиц. Более детальное описание структуры F_0 и механизма сопряжения переноса протонов с вращением блока *с*-субъединиц можно найти в обзоре [19]. На втором этапе последовательное взаимодействие специфических аминокислотных остатков вращающейся γ -субъединицы с аминокислотными остатками

А.Н.Мальяі	H
------------	---

каждой из β -субъединиц индуцирует конформационные изменения каталитических центров, приводящие к связыванию ADP и фосфата, их превращению в ATP и его диссоциации. Возможность вызываемого вращением γ -субъединицы вращение гетерогексамера $\alpha_3\beta_3$, предотвращается взаимодействием одной из α -субъединиц с δ -субъединицей, прочно связанной с фиксированными в мембране *b*-субъединицами (рис. 1) [20]. Таким образом, второй этап включает превращение механической энергии «ротора» в химическую энергию макроэргических связей ATP. Гидролиз ATP вызывает вращение «ротора» в обратную сторону, соответственно изменяя направление трансмембранного переноса протонов.

Важным условием высокой каталитической активности F_F,-ATPa3 является согласованное (кооперативное) функционирование каталитических центров, позволяющее использовать энергию связывания субстратов реакции для диссоциации ее продуктов (принцип рекуперации энергии) [21-23]. Детальная схема кооперативного катализа с участием трех каталитических центров, а также диаграммы изменений энергетических уровней фермента в ходе реакции представлены в работах [24–26]. Согласно [27, 28], возрастание скорости реакции при переходе к кооперативному катализу от одноцентрового катализа, реализующегося при соотношении субстрат/фермент <1, составляет 5-6 порядков. Принято считать, что согласование отдельных стадий реакции на трех каталитических центрах осуществляется вращающейся у-субъединицей. Следует, однако, отметить, что различия в активностях субкомплексов F_1 , содержащих ($\alpha_2\beta_2\gamma$) и не содержащих γ -субъединицу ($\alpha_{3}\beta_{3}$), составляют много меньшую величину [29, 30]. Это позволяет предположить, что определенный вклад в кооперативное функционирование каталитических центров наряду с у-субъединицей вносят взаимодействия α-β субъединиц. В пользу такого предположения свидетельствуют обнаруженные недавно последовательные конформационные изменения β-субъединиц, сопровождающие гидролиз АТР ферментом дефицитным по ү-субъединице [31].

НУКЛЕОТИД-ЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ/ИНАКТИВАЦИЯ $\mathrm{F_oF_1}$ - И $\mathrm{F_1}$ -АТРаз

Снижение величины трансмембранного градиента протонов вызывает обратимую Mg^{2+} и ADP-зависимую инактивацию F_0F_1 -ATPaз различного биологического происхождения [32–35]. В случае изолированной F_1 -ATPaзы, содержащей прочно связанный на каталитическом центре ADP, процесс инактивации инициируется добавкой в среду ионов Mg^{2+} [36–43]. Неорганический фосфат, ATP и некоторые оксианионы

стабилизируют активность F_oF₁-ATPaз и переводят F₁-ATPaзы из неактивного в активное состояние [32–34, 36, 38–46]. Полная активация F_oF₁-ATPaз достигается при возрастании трансмембранного потенциала протонов. Обнаружена четкая корреляция между инактивацией/активацией и прочным связыванием/дисоциацией ADP с одного из каталитических центров [38, 47–50].

При моделировании процесса инактивации на изолированном сопрягающем факторе хлоропластов (CF₁) методом предстационарной кинетики показано, что инактивация сопровождается дифференциацией свойств трех каталитических центров: один из них прочно связывает MgADP, другой – MgATP, тогда как третий теряет сродство к нуклеотидам [42]. Аналогичный вывод сделан на основании рентгеноструктурного анализа сопрягающего фактора митохондрий MF₁ [51].

Считается, что способность к прочному связыванию MgADP и, соответственно, к инактивации в значительной степени определяется асимметричным взаимодействием γ -субъединицы с каждой из 3-х β -субъединиц F₁: препараты F₁ с удаленной γ -субъединицей не инактивировались MgADP [52]. С другой стороны, изучение предстационарной кинетики гидролиза ATP привело к предположению, что прочность связи MgADP с каталитическим центром и, соответственно, степень инактивации зависят от связывания ATP с некаталитическими центрами [53, 54]. Необходимость выяснения механизма Mg²⁺- и ADP-зависимой регуляции активности F₀F₁-ATPa3 потребовала более глубокого изучения свойств некаталитических центров.

III. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ F₁-АТРаз

СТРУКТУРА НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ F₁-АТРаз

Некаталитические центры F_1 -АТРаз, так же как и каталитические центры, расположены на границе раздела α - и β -субъединиц, но в отличие от последних включают в основном аминокислотные остатки, принадлежащие α -субъединице. Структуры обоих типов центров проявляют определенное сходство. Они содержат домен, обеспечивающий взаимодействие с адениновой частью нуклеотида, включающий остаток тирозина (применительно к некаталитическим центрам митохондриального фактора F_1 это β Туг368 [51]), положительно заряженный остаток лизина (α Lys175), взаимодействующий с отрицательно заряженными атомами кислорода полифосфатной части нуклеотида, остаток треонина (α Thr176),

ответственный за связывание иона магния, в свою очередь взаимодействующего с полифосфатным хвостом ADP или ATP. Lys175 и Thr176 входят в состав Р-петли (также называемой мотивом А Уокера – GXXXXGKT/S), характерной для белков, связывающих нуклеотиды [55, 56]. Ион магния через молекулу воды связывается также с остатком αAsp269, принадлежащим к другой консервативной последовательности, мотиву В Уокера [56]. Среди других остатков, входящих в нуклеотидсвязывающий центр, следует отметить αGln208, соответствующий по положению βGlu188 каталитического центра. Последний, как предполагается, непосредственно участвует в катализе, выполняя роль льюисовского основания. Замена кислорода аминогруппой в αGln208 и ориентация боковой цепи в противоположную от у-фосфата сторону, вероятно, объясняют причину отсутствия каталитической активности некаталитических центров. С таким предположением согласуется появление каталитической активности в этих центрах в результате замены направленным мутагенезом остатка глутамина на глутаминовую кислоту [57].

СВОЙСТВА НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ F₁-АТРаз

Решающую роль в изучении свойств некаталитических центров сыграла разработка метода оценки избирательного связывания нуклеотидов с этими центрами. Метод использует большие различия в скоростях обмена нуклеотидов на некаталитических и каталитических центрах. Первый этап определения состоит в заполнении всех обменивающихся центров радиоактивным нуклеотидом, второй - в избирательном замещении нуклеотидов на каталитических центрах нерадиоактивным АТР ("chase") в ходе АТРазной реакции, и третий в быстром (по сравнению со скоростью обмена нуклеотидов на некаталитических центрах) удалении свободных нуклеотидов из реакционной среды с помощью форсированной гель-фильтрации и последующего определения прочно связанных нуклеотидов по радиоактивности образцов ([58-61]. Позднее был предложен еще один метод оценки включения нуклеотидов в некаталитические центры [62]. С помощью направленного мутагенеза авторы вводили в некаталитический центр триптофан и определяли гашение его флуоресценции, вызываемое связыванием нуклеотида с этим центром.

Взаимодействие некаталитических центров с нуклеотидами

Некаталитические центры F₁-ATPaз различного происхождения могут связывать до трех молекул ATP или двух молекул ADP на моль фермента [60–62]. Сродство к центрам сильно возрастает в

присутствии ионов Mg^{2+} . Зависимость связывания нуклеотидов от Mg^{2+} согласуется с наличием в пространственной структуре F_1 , полученной рентгеноструктурным анализом, трех молекул MgATP, включенных в некаталитические центры [63]. АМР ни в свободном виде, ни в виде комплекса с магнием с некаталитическим центрами не связывается [62]. Помимо адениннуклеотидов с некаталитическими центрами способны связываться GTP, GDP, ITP, а также некоторые аналоги нуклеотидов – FSBA, AMP-PNP, 2-азидо-ATP, 2-азидо-ADP [43, 51, 64–68].

Было обнаружено, что некаталитические центры неравноценны: лишь 2 центра митохондриального F_1 сохраняют нуклеотиды после осаждения сульфатом аммония [58] и только 2 центра CF_1 сохраняют нуклеотиды в процессе теплоактивации фермента в присутствии ADP. При инкубации с ATP происходит связывание ATP с третьим (вакантным) центром и замещение ADP на втором центре [61]. Неоднородность центров, очевидно, является следствием определенных различий в их структуре. Так, остаток β Arg372 входит только в центр, принадлежащий α_E -субъединице (обозначения субъединиц согласно [51]), остатки β Arg356 и β Tyr368 – в центр, образуемый α_{DP} -субъединицей.

В отличие от некаталитических центров митохондриальной и хлоропластной F_1 -АТРаз, центры $F_1 E. coli$, согласно работам [62, 70], характеризуются сходством в избирательности к АТР и ADP (K_d для MgATP и MgADP равны 20 мкМ). В отсутствие данных о пространственной структуре фермента из *E. coli* и детальных кинетических исследований трудно судить, вызваны ли эти отличия особенностями экспериментального подхода [71], качествами использованного препарата фермента или видовой специфичностью F_1 . Следует отметить, что о неоднородности некаталитических центров $F_1 E. coli$ свидетельствуют данные другой работы, согласно которым ADP и ATP порознь способны связывать лишь два центра и только при их совместном присутствии заполняются все три некаталитических центра [72].

Неоднородность центров CF₁, активированного дитиотрейтолом, четко проявляется при анализе кинетики связывания нуклеотидов. Анализ указывает, что связывание включает быструю обратимую и медленную слабо обратимую стадии [73]. Константы равновесия быстрой стадии (K_1) применительно к двум некаталитическим центрам CF₁, находятся в пределах 1–9 мкМ при несколько более высоком сродстве одного из центров к ATP, а другого – к ADP. Константы скоростей стадий прочного связывания (k_2) находятся в пределах

A.H.	Мальян
------	--------

0.1–6.7 мин⁻¹, различаясь для обоих центров в 8 раз – для АТР и в 50 раз – для ADP. Кинетика диссоциации нуклеотидов описывается уравнением первого порядка и характеризуется константами скоростей диссоциации (k_3) 1·10⁻³ мин⁻¹ (ATP) и 1.5·10⁻¹ мин⁻¹ (ADP) без заметных различий между центрами [73]. Третий некаталитический центр исследуемого препарата фермента был занят эндогенным ADP и в отличие от теплоактивированного фермента [61] не обменивался с реакционной средой. Указанные соображения определили следующую схему взаимодействия нуклеотидов с некаталитическими центрами CF₁:

$$\operatorname{AT}(D)P + \operatorname{CF}_1 \xleftarrow{k_1} \operatorname{AT}(D) \cdot \operatorname{CF}_1 \xleftarrow{k_2} \operatorname{AT}(D)P > \operatorname{CF}_1 \xleftarrow{k_3} \operatorname{AT}(D)P + \operatorname{CF}_1.$$

Взаимодействие некаталитических центров с оксианионами

Интерес к изучению взаимодействия F₁-ATPa3 с оксианионами в значительной мере обусловлен способностью ряда оксианионов к реактивации MgADP-инактивированной формы фермента. Такой спосообностью обладают анионы сульфита, бикарбоната, бората, фосфата и некоторые другие [41, 44, 74, 75]. Литературные данные указывают на возможность связывания оксианионов как с каталитическими, так и с некаталитическими центрами. В пользу связывания с каталитическими центрами говорит конкуренция между сульфитом и фосфатом в реакции фотофосфорилирования [76, 77], ингибирование сульфитом начального этапа предстационарной кинетики гидролиза АТР (в отсутствие инактивации MgADP) [78]), а также включение иона сульфата или фосфата в пространственную структуру одного из трех каталитических центров F₁ [79, 80]. В пользу связывания с некаталитическими центрами – подавление сульфатом, сульфитом и некоторыми другими стимулирующими гидролиз оксианионами включения нуклеотидов в некаталитические центры [60, 81, 82]. Способность оксианионов связываться с обоими видами центров оставляла открытым вопрос о том, взаимодействие с каким из этих центров (либо специальным центром), вызывает реактивацию фермента. Анализ предстационарной кинетики Mg-зависимого гидролиза АТР CF₁-АТРазой позволил сделать вывод, что центры, ответственные за реактивацию (стимуляцию реакции) не совпадают с каталитическими центрами [78]. В последующих работах были получены данные, свидетельствующие о том, что активация обусловлена взаимодействием оксианионов с некаталитическими центрами. В частности, было найдено, что концентрации оксианионов (сульфита, бикарбоната или бората), вызывающие полумаксимум активации

соответствуют концентрациям оксианионов, вызывающим полумаксимум ингибирования включения радиоактивного АТР в некаталитические центры [81]. В работе [83] было использовано свойство оксианиона пирофосфата избирательно и прочно связываться с некаталитическими центрами F_1 -АТРаз [70, 84, 85]. Длительное время диссоциации комплекса PP_i с CF₁ ($t_{1/2}$ = 14 мин) позволило исследовать эффект оксианионов на выделенном комплексе, освобожденном от слабо связанных соединений. Прочное связывание PP_i с некаталитическими центрами на стадии преинкубации подавляло способность оксианионов сульфита и бикарбоната стимулировать Mg-зависимую АТРазную активность фермента, а диссоциация пирофосфата коррелировала с восстановлением их активирующего действия, свидетельствуя о конкуренции этих оксианионов и PP_i за связывание с одним и тем же центром.

Было выяснено, что константы скоростей диссоциации комплексов ADP и ATP с некаталитических центров активированного дитиотриэтолом фермента (0,15 и 0,001 мин⁻¹ [73]) значительно ниже констант скоростей стимуляции оксианионами MgADP-инактивированного фермента (около 1 мин⁻¹ [78]). В то же время оксианионы проявляли себя как весьма слабые конкуренты по отношению к ADP и ATP [81, 86]. Поскольку и те и другие связываются с некаталитическими центрами возникает вопрос, каким образом оксианионы оказывают стимулирующий эффект в условиях высоких концентраций нуклеотидов в реакционной среде. Выше уже указывалось, что некаталитические центры CF, и АТР-синтазы неоднородны: один из них проявляет высокую специфичность к АТР, другой – к АDP, а третий связывает АТР и ADP с близкой эффективностью [61]. Два последних центра, связывая ADP, сохраняют свободные участки, соответствующие положению у-фосфата ATP или неорганического фосфата. Ввиду структурного сходства оксианинов с ионом фосфата [87] эти участки могут являться центрами связывания оксианионов. Поскольку один из них проявляет специфичность к ADP, более вероятным центром связывания оксианионов является центр, способный взимодействовать с обоими нуклеотидами. Такое предположение согласуется с первым порядком реакции активации фермента сульфитом [78]. Следует, однако, оговориться, что специфичность одного из центров к ADP не абсолютна: при длительной инкубации в присутствии избытка MgATP возможно включение АТР во все три некаталитических центра [61]. Следовательно, при высокой концентрации оксианиона нельзя исключить его связывание по второму центру.

А.Н.Мальян

РОЛЬ НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ В МОДУЛЯЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ F₁-ATPa3

Первые свидетельства о роли некаталитических центров в проявлениях каталитической активности F_1 были получены, когда было показано, что ковалентная модификация некаталитических центров вызывает инактивацию фермента [65, 67, 68], а связывание АТР с этими центрами влияет на его GTPазную активность ([59]. Позднее было найдено, что связывание АТР с некаталитическими центрами является необходимым условием проявления АТРазной активности CF_1 и MF_1 [60, 84]). При этом замена АТР на GTP даже на одном из некаталитических центров вызывает значительное снижение активности [43, 61].

Следует отметить, что тезис о функциональной роли некаталитических центров разделяется не всеми исследователями [70, 88, 89]. Указывается, что заполнение центров не влияет на «одноцентровый» катализ АТРазной реакции (в условиях, когда вследствие низкой концентрации субстрата заполняется лишь один из трех каталитических центров фермента) [90]. Отсутствует влияние на максимальную скорость рекции [88]. Отсутствует влияние мутации остатка αD261N (нумерация F, E. coli), участвующего в связывании магния в некаталитическом центре [91]. Не наблюдается эффекта от заполнения некаталитических центров АТР или ADP при окислительном фосфорилировании [91]. Однако детальный анализ данных, приведенных в указанных работах, и сопоставление с результатами других исследований не дают оснований для вывода об отсутствии функциональной роли некаталитических центров. В частности, в результате изучения предстационарной кинетики гидролиза ATP MF, было показано, что стимулирующее гидролиз действие некаталитических центров проявляется только при концентрациях АТР, достаточных для заполнения некаталитических центров, и сказывается на исчезновении эффекта отрицательной кооперативности (увеличение значений К_т, вызываемое аномально сильным ускорением реакции в области концентраций АТР 100-300 мкМ) [53, 92]. Отсутствие влияния заполнения некаталитических центров ADP на скорость реакции, описанное в работе [88], вероятно, обусловлено тем, что при определении активности время инкубации было сопоставимо со скоростью обмена связанного ADP на ATP. Мутация остатка αD261N замедляет, но не исключает связывание АТР с некаталитическими центрами [93]. Наконец, было продемонстрировано 2-3-кратное ускорение синтеза АТР АТР-синтазой термофильных бактерий в протеолипосомах при заполнении некаталитических центров АТР [94].

Анализ предстационарной кинетики гидролиза ATP F_1 -ATPaзами показал, что стимуляция активности, вызываемая взаимодействием ATP с некаталитическими центрами фермента, объясняется ослаблением прочного связывания MgADP с одним из каталитических центров [53, 54]. Снижение эффективности такого взаимодействия путем направленного мутагенеза одного из аминокислотных остатков в некаталитическом центре (D261N) замедляло активацию [93], а более глубокая модификация центра с заменами нескольких остатков (R175, T176, D261 и D262) на аланин исключала диссоциацию MgADP, делая инактивацию практически необратимой [92, 95, 96]. Отметим, что мутант также терял способность к вызываемой оксианионами активации и диссоциации ингибиторного MgADP [57].

Описанная выше неоднородность некаталитических центров позволяла предполагать определенные различия в функциональной роли каждого из центров. Однако, литературные данные по этому вопросу неоднозначны. Согласно работе Буллоу с соавт. (Bullough et al. [68]) при взаимодействии FSBA с MF, эффект аналога коррелировал с модификацией третьего некаталитического центра, тогда как модификация первых двух не сказывалась ни на ADP-индуцируемой инактивации, ни на отрицательной кооперативности. Аналогичная корреляция обнаруживалась при оценке реактивации MgADP-ингибированного MF₁, вызываемой последовательным заполнением нуклеотидами некаталитических центров [84]. Полная инактивация MF₁-ATPазы происходила при дериватизации 2-азидо-АТР двух некаталитических центров [67]. Стимуляция гидролиза пирофосфатом проявлялась при заполнении РР, второго и третьего некаталитического центра [97]. Активность СF, проявлялась при условии включения ATP в некаталитический центр, остающийся вакантным при теплоактивации фермента в присутствии ADP (обозначенный авторами как центр A), тогда как замена ATP на ADP в слабо обменивающем нуклеотиды центре С на активность не влияла [61]. Другая группа исследователей сравнивала активность препаратов $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплекса F₁-ATPaзы из *Bacillus PS3* с 1, 2 и 3 некаталитическими центрами, не способными связывать нуклеотиды [98]. Авторы нашли, что уже одного функционирующего центра достаточно для проявления заметной активности, тогда как максимальная активность достигается при участии трех некаталитических центров. При определенных различиях все эти данные свидетельствуют о влиянии состояния некаталитических центров на каталитические. Имеются также данные о влиянии каталитических центров на свойства некаталитических: в условиях гидролиза АТР митохондриальным F, и F, из E. coli диссоциация нуклеотидов с некаталитических центров ускорялась в 8 и в 23 раза, соответственно [58, 72].

А.Н.Мальян

IV. СВОЙСТВА НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ АТР-СИНТАЗНЫХ КОМПЛЕКСОВ

СВОЙСТВА НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ ИЗОЛИРОВАННЫХ АТР-СИНТАЗНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Изолированные комплексы АТР-синтазы можно рассматривать как переходную ступень от водорастворимых сопрягающих факторов, представляющих по сути модельные системы, к нативным системам, включающим комплексы, интегрированные в мембранах. В этой связи изучение свойств некаталитических центров изолированных АТР-синтазных комплексов представляет несомненный интерес. К настоящему времени наиболее полно исследован АТР-синтазный комплекс хлоропластов [99, 100]. Выделенный комплекс содержал 3 эндогенных нуклеотида: 2 ATP на некаталитических центрах и 1 ADP на одном из каталитических. Варьируя условия инкубации с ADP, АТР и его ковалентно связывающимся аналогом 2-азидо-АТР, авторы добились получения препарата, содержащего 5 нуклеотидов/моль комплекса: З АТР, включая его аналог, на некаталитических центрах и 2 ADP - на каталитических. Некаталитические центры существенно отличались между собой по стабильности образуемых с АТР комплексов: константа диссоциации одного из них составляла около 50 мкМ, второго - около 2 мкМ, константа третьего находилась в наномолярной области. Авторы отмечают также взаимодействие между каталитическими и некаталитическими центрами. В частности, включение ADP в один из каталитических центров способствовало диссоциации ATP с некаталитического центра.

В результате анализа пептидов, получающихся трипсинолизом ATP-синтазных комплексов после их инкубации с ковалентно сязывающимися радиоактивными 2-азидо производными ADP и ATP, авторы пришли к заключению, что некаталитические центры CF_0F_1 связывают ATP, но не связывают ADP. Следует отметить, однако, что это заключение вступает в определенное противоречие с показанной выше способностью некаталитических центров сопрягающего фактора CF_1 , а также комплекса термофильной бактерии TF_0F_1 связывать ADP [58, 70, 79, 88]. В пользу способности некаталитических центров CF_0F_1 включать ADP свидетельствуют также следующие соображения. Согласно работе самих авторов [100], на некаталитических центрах обнаруживалось до 15–20% 2-азидо ADP, несмотря на то, что при ковалентной модификации использовался 2-азидо-ATP. Авторы отмечают, что при длительной инкубации с ЭДТА прочно связанный на некаталитическом центре ATP превращается в ADP. Очевидно,

нельзя исключить, что указанные 15–20% 2-азидо-ADP образуются из прочно связанного на некаталитическом центре 2-азидо-ATP. Что касается ранее опубликованных авторами результатов опытов с 2-азидо-ADP [99], то выявленное в работе отсутствие связанного с этим центром 2-азидо-ADP, вероятно, объясняется значительно меньшей стабильностью комплексов ADP с некаталитическим центрами по сравнению с ATP (см. предыдущий раздел) и диссоциацией ADP при удалении свободных нуклеотидов трехкратной гель-фильтрацией с применением элюирующих растворов, не содержащих магний [61, 96].

В согласии с результатами исследований сопрягающих факторов F, различного происхождения связывание 2-азидо-ATP с некаталитическими центрами и ковалентная модификация входящего в эти центры βТуr385 не оказывали влияния на активность CF₆F₁ в режиме одноцентрового катализа. Однако, в отличие от результатов, полученных на F₁ [53, 54, 59, 61, 98] и TF₀F₁ [94], заполнение всех некаталитических центров CF F, нуклеотидами не влияло на активность фермента в режиме кооперативного (трехцентрового) катализа [100]. Подавление кооперативного катализа наблюдалось лишь при ковалентном связывании 2-азидо-АТР, при этом для полного ингибирования оказывалось достаточным модификации лишь одного из трех центров. В согласии с этими данными ковалентная модификация одного из центров АТР-синтазного комплекса из термофильной бактерии TF_F_ полностью подавляла синтез и гидролиз АТР в протеолипосомах [102]. Можно предположить, что ковалентная модификация βTyr385 ограничивает конформационную подвижность некаталитического центра, необходимую для кооперативного катализа.

ВЛИЯНИЕ ЭНЕРГИЗАЦИИ МЕМБРАНЫ НА СВОЙСТВА НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ

Для выяснения возможной роли некаталитических центров в регуляции активности ATP-синтаз весьма важным является выяснение влияния энергизации мембраны на их свойства. Согласно приведенным выше данным работы [73], комплекс ATP с некаталитическими центрами изолированного CF₁ весьма стабилен ($k_3 = 1 \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹), что практически исключает его участие в регуляции активности. При энергизации мембраны искусственным градиентом $\Delta pH/\Delta \psi$ авторы работы [100] наблюдали незначительное освобождение примерно 4–6% связанного в некаталитическом центре 2-азидо-ATP. Авторы объяснили его обменом между каталитическими и некаталитическими центрами во время реконструкции ATP-синтазы в липосомы и пришли к выводу об отсутствии влияния энергизации

А.Н.Малья	н
-----------	---

на свойства некаталитических центров. Следует отметить, что интерпретация результатов такого исследования затрудняется краткой продолжительностью периода энергизации мембраны (порядка 5 с). Очевидно, что если время диссоциации нуклеотида с некаталитических центров превышает эту величину, результат будет находиться в пределах экспериментальной ошибки.

Важным шагом для выяснения регуляторной роли некаталитических центров явилась разработка модификации метода «cold chase» применительно к определению связывания нуклеотидов с АТР-синтазой тилакоидных мембран [101]. Принципиальная возможность применения такого метода открылась, когда была показано, что присутствие сульфита обеспечивает высокую скорость гидролиза ATP в темноте тилакоидными мембранами, предварительно активированными светом и дитиотрейтолом [45]. Применение указанной методики позволило обнаружить, что уровень включения нуклеотидов в некаталитические центры АТР-синтазы тиолакоидных мембран в темноте очень низок (менее 0,1 моль/моль АТР-синтазы) [101]. При сравнении доступности некаталитических центров к обмену нуклеотидами с реакционной средой следует отметить зависимость обмена от нативности исследуемого препарата: на CF₁, активированном теплом в присутствии ADP, нуклеотидами заполняется до 3 некаталитических центров, на CF₁, активированном дитиотрейтолом, – 2 центра, на изолированном CF₀F₁ – 1 центр и почти полное отсутствие связывания нуклеотидов СГ Г, тилакоидных мембран.

Вызываемая светом энергизация мембран вызывала многократное увеличение включения нуклеотидов в некаталитические центры. Максимальлное включение составляло 1,6 нмоль/мг хлорофилла, что при указанном в литературе соотношении 1 нмоль CF $_{0}^{F_{1}}/Mr$ хлорофилла [45, 103] и с учетом возможных потерь [104] соответствует 2 моль/моль фермента. При этом на некаталитических центрах обнаруживается как ADP, так и ATP [105]. Третий некаталитический центр ATP-синтазы, повидимому, не участвует в энергозависимом обмене. Такое предположение согласуется с выводом о высокой стабильности комплекса ATP с этим центром, показанной на изолированном CF $_{0}^{F_{1}}$ [100], а также с данными о сохранении ATP, связанном на ATP-синтазном комплексе тилакоидных мембран, после активации светом в присутствии тиоредоксина и дитиотрейтола и последующей отмывки от свободных нуклеотидов [106].

Интересно отметить, что достаточно высокий уровень темнового включения нуклеотидов в CF_0F_1 достигался при условии предварительного освобождения некаталитических центров от нуклеотидов [107]. Из этого следует, что лимитирующей стадией их взаимодействия с некаталитическими центрами ATP-синтазы является диссоциация связанного нуклеотида. Скорость энергозависимой диссоциации заметно снижалась при увеличении концентрации Mg^{2+} . Константы скорости диссоциации ADP и ATP были близки, составляя (при 1 мМ $MgCl_2$) 5,7 мин⁻¹ и 5,0 мин⁻¹, соответственно [105]. Отметим, что эти величины почти на 2 порядка ниже константы скорости энергозависимой диссоциации ADP, прочно связанного на каталитическом центре [50].

Описанные выше применительно к сопрягающим факторам и АТР-синтазным комплексам различного биологического происхождения неоднородность и взаимное влияние некаталитических центров четко проявляются в условиях энергизации мембраны. При варьировании концентраций нуклеотидов в среде инкубации и высоком соотношении ATP/ ADP содержание включенного в некаталитические центры АТР лимитировалось количеством включенного ADP. В условиях избытка ADP такой взаимозависимости не наблюдалось [107]. Увеличение соотношения ATP/ADP в среде инкубации при сохранении суммарной концентрации нуклеотидов приводило к снижению суммарного включения в АТР-синтазу [105]. Анализ этих данных приводит к заключению о кооперативном функционировании двух некаталитических центров. Связывание ADP на одном из из них (центр В или 5 в класификации [61] и [100], соответственно) является необходимым условием заполнения второго центра АТР (центр А или 6). Однако связывание ADP с центром 6 не требует включения ATP в центр 5. При соизмеримом соотношении ATP и ADP в среде связывание АТР с центром 6 и АDP с центром 5 характеризуется близкими значениями констант диссоциации (2,0±0,3 мкМ). В условиях избытка АТР включение его в центр 6 определяется $K_{A} = 33 \pm 8$ мкM, а включение молекулы ADP в этот центр (при избытке ADP) $K_{d} = 38 \pm 18$ мкМ [108].

Кинетические параметры энергозависимого обмена нуклеотидов на некаталитических центрах весьма близки параметрам активации/ инактивации индуцирумой освещением АТРазной активности АТР-синтазы хлоропластов. Действительно, константа диссоциации ADP с центра 6 (38±18 мкМ) в пределах экспериментальной ошибки соответствует центру, ответственному за подавление АТРазной активности, вызываемой световой преинкубацией в присутствии ADP





Рис. 2. Схема инактивации/активации СF₁-АТРазы хлоропластов.

НЦ и КЦ – некаталитические и каталитические центры, соответственно; ADPtb – прочно связанный ADP. Пустой клетке соответствует либо свободный каталитический центр, либо центр со слабо связанным ATP. Соотношение между этими состояниями центра определяется концентрацией ATP.

(45±12 мкМ) [108]. Константа скорости инактивации (1±0,2 мин⁻¹) согласуется со временем достижения полумаксимума обмена на некаталитических центрах (около 1 мин) [107], которое в свою очередь совпадает со временем световой преинкубации с АТР необходимым для стимуляции АТРазной активности [109]. Наконец, константа диссоциации АТР с центра, ответственного за стимуляцию (27±2 мкМ) [108] близка константе диссоциации АТР с некаталитического центра 6 (33±8 мкМ). Указанные совпадения свидетельствуют в пользу предположениея о том, что некаталитический центр 6 ответственен за регуляцию АТРазной активности АТР-синтазы.

Принимая во внимание приведенные выше соображения, можно представить следующую схему обратимой инактивации F₁- и F₂F₁-ATPa3 (рис. 2).

Активной форме фермента соответствует состояние с АТР, связанном на некаталитическом центре, способном взимодействовать с обоими нуклеотидами. Замена АТР на ADP в условиях энергизации мембраны, вызывает увеличение сродства ADP к каталитическому центру и его прочное связывание, которое приводит к инактивации фермента. Энергизация мембраны в условиях избытка ATP ускоряет обмен ADP на ATP на некаталитических центрах, вызывая реактивацию ATPазной активности фермента.

312

V. МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕНТРОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ F₀F₁-ATPa3

Зависимость каталитической активности F₂F₁-ATPa3 от природы нуклеотидов, связанных на некаталитических центрах, предполагает наличие молекулярных структур, ответственных за передачу конформационного сигнала между некаталитическими и каталитическими центрами. Поиск таких структур опирался на описанное выше свойство некаталитических центров влиять на кооперативные свойства фермента, не затрагивая одноцентровый катализ [54, 92]. Представлялось логичным, чтобы в состав этих структур входили аминокислотные остатки, непосредственно принадлежащие к обоим типам центров, так как даже незначительные изменения координат этих остатков вызывают существенные изменения активности. Было сделано предположение [110], что роль такой структуры может играть короткая последовательность ВТ354-ВҮЗ45, соединяющая остаток αQ172 (через водородную связь с βT354) некаталитического центра с остатком ВУ345, входящим в каталитический центр (нумерация F, митохондрий). Связь между этими центрами дополнительно фиксируется солевым мостиком αR171-βD352. В результате мутации остатка αQ172, входящего в Уокер А мотив, авторы наблюдали подавление эффекта отрицательной кооперативности связывания АТР.

Автор другой работы [111] при поиске молекулярных структур, способных к передаче сигнала между некаталитическими и каталитическими центрами, опирался на представления о белковых молекулах как о системах, отдельные части которых обладают выделенными степенями свободы и могут переносить конформационный сигнал без потери энергии (по принципу заключенного в оболочку гибкого троса) от одного участка молекулы к другому [112]. Одним из условий минимального рассеяния энергии сигнала является минимальная длина такого участка. Этим условиям отвечают участки, расположенные внутри молекулы белка, длина которых близка минимальному расстоянию между каталитическим и некаталитическим центрами. Согласно работе [51], это расстояние составляет для митохондриального F₁ 27 Å. Следовательно, при средней длине одного звена полипептидной цепи 3,6 Å [113], сегмент субъединицы, соединяющий соседние нуклеотидсвязывающие центры, должен включать минимум 8 или, учитывая плотность белковой упаковки, несколько более аминокислот. Одним из таких участков является сегмент β-субъединицы, соединяющий Y345 и R356, весьма близкий к последовательности, обнаруженной авторами [110].

	КЦ	НЦ
β-хлоропласты шпината	Y(362)	PAVDPLDSTST (373)
β-Sy6301	Y(352)	PAVDPLDSTST(363)
β-митохондрии сердца быка	Y(345)	PAVDPLDSTSR(356)
β-E. coli	Y(331)	PAVDPLDSTSR (342)
	КЦ	НЦ
α-хлоропласты шпината	S(336)	TDGQIFLSADLF(349)
α-Sy6301	S(336)	TDGQIFLSSDLF(349)
α-митохондрии сердца быка	S(344)	ITDGQIFLETELF(357)
α-E. coli	S(347)	ITDGQIFLETNLF(360)
НЦ	нц	КЦ
α-хлоропласты шпината	R(354)	PAINVGISVSR(365)
α-Sy6301	R(354)	PAINVGISVSR(365)
α-митохондрии сердца быка	R(362)	PAINVGLSVSR(373)
α-E. coli	R(365)	PAVNPGISVSR(376)

Рис. 3. Аминокислотные последовательности, соединяющие каталитический (КЦ) и некаталитический (НЦ) центры. Консервативые остатки показаны черным цветом. (Адаптировано из [111]).

Практически полное совпадение аминокислотных последовательностей β-субъединиц сопрягающих факторов различного биологического происхождения в пределах этого участка свидетельствует о его консервативности (рис. 3). Указанный сегмент отвечает требованию сохранения энергии при передаче импульса от одного его конца к другому [112]: ни один аминокислотный остаток сегмента, за исключением D352, не вступает в кулоновское взаимодействие с окружающими остатками, а упомянутый остаток D352, взаимодействуя с R171, может передавать сигнал на Q172, располагающийся наряду с R356 рядом с фосфатным концом нуклеотида в том же некаталитическом центре. ҮЗ45 входит в состав каталитического центра [51] и находится менее чем в 3,5 Å от пуриновой части адениннуклеотида (рис. 4a). R356 принадлежит некаталитическому центру и находится почти на таком же расстоянии от у-фосфата АТР. Предполагается, что Y345 обеспечивает гидрофобное окружение аденина [70, 114]; его энергия взаимодействия с АТР составляет 1,5 ккал/моль [70]. Увеличение гидрофобности окружения путем замены остатка тирозина на





фенилаланин приводило к ослаблению MgADP-зависимой инактивации фермента [114]. Еще большее ослабление инактивации имело место при замене ATP на более гидрофобный ε-ATP [115]. При оценке влияния замены Y345 на каталитическую активность просматривается зависимость от размера остатка (снижение сродства в ряду Tyr>Leu>Ala более 10 раз) [116]. Влияние замены R356 на другие аминокислотные остатки не исследовалось. Интересно, однако, отметить, что гомологичный этому остатку и находящийся в том же положении, но в каталитическом центре αR373 обладает сильно выраженной способностью к изменению положения, сдвигаясь на 1,5 Å при замене ADP на ATP [70].

В рамках предложенного механизма можно следующим образом объяснить активирующее действие ATP и оксианионов. При связывании ATP с некаталитическим центром появление γ-фосфата должно вызывать изменение положения R356. Это движение будет передаваться вдоль аминокислотной последовательности S355–P346 на Y345. Поперечные деформации цепи, связанные с потерями энергии, предотвращаются плотной упаковкой белковой молекулы («оболочка троса»). Изменение положения Y345, сопровождающееся изменением гидрофобных взаимодействий с пуриновой частью ADP, прочно связанного на каталитическом центре, приведет к ослаблению этой связи и будет инициировать последующий переход фермента из неактивного состояния в активное. Аналогичное действие будут оказывать оксианионы, связывающиеся, согласно [81, 83], в некаталитическом центре на месте γ-фосфата.

Два других сегмента, связывающих некаталитический центр с соседним каталитическим центром, принадлежат α-субъединице. Как видно на рис. 3, они также являются консервативными. Один из них начинается от F357, располагающегося около рибозного кольца АТР в некаталитическом центре, и заканчивается S344, локализованным рядом с у-фосфатом АТР каталитического центра (рис. 4б). Замена αF357 и расположенного рядом βR372 на цистеин снижала способность MgADP к диссоциации, индуцируемой связыванием АТР с некаталитическим центром, а ограничение подвижности в результате образования дисульфидной связи - к потере способности к его диссоциации [117]. Мутация αS344F многократно снижала каталитическую активность фермента [118]. Принадлежащий к этому сегменту остаток αD347 тесно связан с входящими в каталитический центр αR373, βR189 и βE192. αR373 является концевым остатком другого сегмента, связывающего каталитический центр с остатком РЗ63, находящимся в некаталитическом

центре рядом с аденином АТР. Согласно [119], R373 не принимает непосредственного участия в каталитическом цикле, но ответственен за согласованное (кооперативное) функционирование трех каталитических центров. В пределах указанных сегментов также находятся несколько аминокислотных остатков, влияние которых на свойства бактериального F, исследовано с помощью точечных мутаций: aS347F, aG351D и aS373F, aS375F (нумерация F, E. coli) [67, 120, 121]. Им соответствуют остатки S344, G348 одного из сегментов и S370, S372 другого сегмента α-субъединицы митохондриального F₁ (рис. 3). Интересно отметить, что, несмотря на различное положение и природу остатков, их изменения вызывали однотипный ответ. При всех мутациях, так же как и при заменах R373, происходило изменение каталитической кооперативности при слабом влиянии на связывание нуклеотидов [117,118]. Общим для этих мутаций было то, что замещающий аминокислотный остаток был значительно больше замещаемого. Названные эффекты хорошо согласуются с представлениями о механической природе передачи конформационного сигнала – увеличение размера любого из аминокислотных остатков в исследуемых последовательностях должно затруднять перемещение всего сегмента полипептидной цепи относительно его окружения и, соответственно, влиять на положение конечного остатка по отношению к ближайшему к нему участку нуклеотида.

Как видно на рис. 4в, описанные сегменты образуют систему связей между всеми каталитическими и некаталитическими центрами. Приведенная схема позволяет объяснить полученные в последние годы данные о возможности согласованного последовательного функционирования каталитических центров F₁-ATPa3 с укороченной с N-и С-концов γ субъединицей и даже в ее отсутствие [31, 122–124].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительный объем накопленной к настоящему времени информации о свойствах некаталитических центров ряд вопросов, касающихся механизма их функционирования, остаются открытыми. Неясны изменения структуры, вызывающие изменения доступности некаталитических центров при переходе от изолированного фермента к ATP-синтазному комплексу, интегрированному в мембрану. Неизвестен механизм энергозависимого ускорения обмена нуклеотидов на некаталитических центрах. Требует дополнительных данных гипотеза о наличии и функциях коротких консервативных аминокис-

А.П.МИЛЬЯН	А.Н.Мал	ьян
------------	---------	-----

лотных последовательностей, соединяющих каталитические и некаталитические центры. В связи с крайне низкой скоростью обмена нуклеотидов на некаталитических центрах длительное время им не приписывалась какая-либо функция, либо предполагалась их чисто структурная роль [70]. Однако сохранение этих центров в течение многих лет эволюции побудило исследователей к более глубокому изучению их свойств. Показанное при энергизации тилакоидных мембран хлоропластов многократное ускорение обмена сделало реальной возможностью их участие в регуляции АТРазной активности АТР-синтаз. Несмотря на отсутствие таких данных в отношении мембран митохондрий и бактерий (главным образом из-за отсутствия методических подходов) высокое сходство в свойствах некаталитических центров F₁-ATPa3 позволяет предполагать аналогичный эффект независимо от их биологического происхождения. На тилакоидных мембранах удалось показать, что роль некаталитических центров состоит в регулировании эффективности MgADP- зависимой инактивации: при связывании ADP на некаталитических центрах MgADP- зависимая инактивация проявляется в максимальной степени и она сильно демфируется при обмене ADP на ATP.

Считается, что физиологический смысл регуляции активности ATP-синтазы заключается в предотвращении бесполезного гидролиза ATP при недостаточной величине трансмембранного градиента протонов. Отметим, однако, что даже при практически полной инактивации остается незначительный уровень активности, и эта активность варьирует в зависимости от окислительно-восстановительного состояния среды, соотношения ADP и ATP, наличия эндогенных стимуляторов гидролиза ATP. По-видимому, нельзя исключить, что, не ограничиваясь предотвращением гидролиза, регуляция в пределах такого низкого уровня активности может иметь физиологический смысл, будучи необходимой для поддержания некоторой минимальной величины трансмембранного потенциала, используемого при недостатке энергетических субстратов (NADH, сукцинат, свет) для активного транспорта ионов, полипептидов и/или метаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

- Stocker, A., Keis, S., Vonck, J., Cook, G. M. (2007) Structure, 15, 904–914.
- Rees, D.M., Leslie, A.G.W., Walker, J.E. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 21597–21601.
- Dautant, A., VeloursJ., Giraud, M.F. (2010) J. Biol. Chem. 285, 29502–29510.
- Giraud, M.F., Paumard, P., Sanchez, C., Brethes, D., Velours, J., Dauant, A. (2012) J. Struct. Biol., 177, 490–497.
- 5. *Groth, G., Pohl, E.* (2001) J. Biol. Chem., **276**, 1345–1352.
- Iino, R., Hasegawa, R., Tabata, K.V., Noji, H. (2009) J. Biol. Chem., 284, 17457–17464.
- 7. Kadoya, F, Kato, S, Watanabe, K, Kato-Yamada, Y. (2011) Biochem. J., **437**, 135–140.
- Corvest, V., Sigalat, C., Haraux, F. (2007) Biochem., 46, 8680–8688.
- Konno, H., Murakami-Fuse, T, Fujii, F. Koyama, F. Ueoka-Nakanishi, H., Pack, C.G., Kinjo, M., Hisabori, T. (2006) EMBO J., 25, 4596–4604.
- Kironde, F.A.S., Cross, R.L. (1987)
 J. Biol. Chem., 262, 3488–3495.
- Xue, Z., Zhou, J.-M., Melese, T., Cross, R.L., Boyer, P.D. (1987) Biochemistry, 26, 3749–3753.
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G., Walker, J.E. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 107, 16823–16827.
- Pogoryelov, D., Yildiz, O, Faraldo-Gómez JD, Meier T. (2009) Nat. Struct. Mol Biol., 16, 1068–1073.
- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H., Mueller, D.J. (2000) Nature, 405, 418–419.
- Varco-Merth, B., Fromme, R., Wang, M., Fromme P. (2008) Biochim. Biophys. Acta, 1777, 605–612.
- 16. Wise, J.G., Hicke ,B.J., Boyer, P.D. (1987) FEBS Lett., **223**, 395–401.

- 17. *Boyer, P.D.* (1993) Biochim. Biophys. Acta, **1140**, 215–250.
- Senior, A.E., Nadanaciva, S., Weber, J. (2002) Biochim. Biophys. Acta, 1553, 188–211.
- 19. Weber J., and Senior A.E. (2003) FEBS Lett., **545**, 61–70.
- Weber, J., Wilke-Mounts, S., Senior, A.E. (2002) J. Biol. Chem., 277, 18390–18396.
- 21. *Repke, K.R.H., Schön, R.* (1974) Acta. Biol. Med. Germ., **33**, K27–K38.
- Блюменфельд Л.А. Проблемы биологической физики. (1977) Москва: Наука, 336 с.
- 23. Kayalar, C., Rosing, J., Boyer, P.D. (1977) J. Biol. Chem., 252, 2486–2491.
- 24. Boyer, P.D. (2002) J. Biol. Chem., 277, 39045–39061.
- Futai, M., Nakanishi-Matsui, M., Okamoto, H., Sekiya, M., Nakamoto, R.K. (2012) Biochim. Biophys. Acta, 1817, 1711–1721.
- Тихонов А.Н., Погребная А.Ф., Романовский Ю.М. (2003) Биофизика, 48, 1052–1070.
- 27. *Grubmeyer, C., Penefsky, H.S.* (1981) J. Biol. Chem., **256**, 3728–3734.
- Duncan, T.M., Senior, A.E. (1985) J. Biol. Chem., 260, 4901–4907.
- Gromet-Elhanan, Z., Avital, S. (1992) Biochim. Biophys. Acta, 1102, 379–385.
- 30. *Gao, F., Lipscomb, B., Richter, M.L.* (1995) J. Biol. Chem., **270**, 9763–9769.
- 31. *Iino, R., Noji, H.* (2012) Biochim. Biophys. Acta, **1817**, 1732–1739.
- Carmeli, C., Lifshitz, Y. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 267, 86–95.
- Bakker-Gruenvald T., Van Dam, K. (1974) Biochem. Biophys. Acta, 347, 290–298.
- Fitin, A., Vasilyeva, E.A., Vinogradov, A. D. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun., 86, 434–439.

- 35. *Vinogradov, A.D., Zharova, T.V.* (2004) J. Biol. Chem., **279**, 12319–12324.
- 36. *Moyle, J., Mitchell, P.* (1975) FEBS Lett., **56**, 55–61.
- 37. *Мальян А.Н., Макаров А.Д.* (1976) Биохимия, **41**, 1087–1093.
- Minkov, I.B., Vasilyeva, E.A., Fitin, A.F., Vinogradov, A.D. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun., 89, 1300–1306.
- 39. *Malyan, A.N.* (1981) Photosynthetica, **15**, 474–483.
- 40. Мальян А.Н., Вицева О.И. (1983) Биохимия, **48**, 718–724.
- 41. *Ebel, R.E., Lardy, H.A.* (1975) J. Biol. Chem., **250**, 191–196.
- 42. *Malyan, A.N., Vitseva, O.I.* (1990) Photosynthetica, **24**, 613–622.
- Guerrero, K.J., Xue, Z., Boyer, P. (1990) J. Biol. Chem., 265, 16280–16287.
- 44. Мальян А.Н., Акулова Е.А. (1978) Биохимия, **43**, 1206–1211.
- 45. Larson, E.M., Jagendorf, A.T. (1989) Biochim. Biophys. Acta, **973**, 67–77.
- Cappellini, P., Turina, P. Fregni, V., Melandri, A. (1997) Eur. J. Biochem., 248, 496–506.
- Strotmann, H., Bickel-Sandkoetter, S. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 460, 126–135.
- 48. Bar-Zwi D., Shavit N. (1982) Biochem. Biophys. Acta, 681, 451–458.
- 49. Drobinskaya, I.E., Kozlov, I.A., Murataliev, M.B., Vulfson, E.N. (1985) FEBS Lett., **182**, 419–423.
- 50. Lohse, D., Strotmann, H. (1989) Biochim. Biophys. Acta, **976**, 94–101.
- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E. (1994) Nature, 370, 621–628.
- 52. Sokolov M., Gromet-Elhanan Z. (1996) Biochemistry, **35**, 1242–1248.
- 53. *Murataliev M.B., Boyer P.D.* (1992) Eur. J. Biochem., **209**, 681–687.
- 54. Jault J.M., Allison W.S. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 1558–1566.

- Saraste, M., Sibbald, P.R., Wittinghoffer, A. (1990) Trends Biochem. Sci., 15, 430–434.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. (1982) EMBO J., 1, 945–951.
- Matsui, T., Jault, J.-M., Allison, W.S., Yoshida, M. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 220, 94–97.
- Penefsky, Y.S. (1977) J. Biol. Chem., 252, 2891–2899.
- 59. Xue, Z., Boyer, P.D. (1989) Eur. J. Biochem., **179**, 677–681.
- Milgrom, Y.M., Ehler, L.L., Boyer, P.D. (1990) J. Biol. Chem., 265, 18725–18728.
- Milgrom, Y.M., Ehler, L.L., Boyer, P.D. (1991) J. Biol. Chem., 266, 11551–11558.
- Weber, J., Wilke-Mounts, S., Grell, E., Senior, A. E. (1994) J. Biol. Chem., 269, 11261–11268.
- 63. Bowler, M.W., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 14238–14242.
- Abbott, M.S., Czarnecki, J.J., Selman, B.R. (1984) J. Biol. Chem., 259, 12271–12278.
- 65. Bullough, D.A., Allison, W.S. (1986) J. Biol. Chem., **261**, 5722–5730.
- Xue, Z., Miller, C.G., Zhou, J.-M., Boyer, P.D. (1987) FEBS Lett., 223, 391–394.
- Cross, R.L., Cunningham, D., Miller, C.G., Xue, Z., Zhou, J.-M., Boyer, P.D. (1987) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84, 5715–5719.
- Bullough, D.A., Brown, E.L., Saario, J.D., Allison, W.S. (1988) J. Biol. Chem., 263, 14053–14060.
- Weber, J., Senior, A.E. (1995) J. Biol. Chem., 270, 12653–12658.
- 70. Weber, J., Senior, A.E. (1997) Biochem. Biophys. Acta, **1319**, 19–58.
- Bulygin, V.V., Milgrom, Y.M. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 104, 4327–4331.

- Hyndman, D.J., Milgrom, Y.M., Bramhall, E.A., Cross, R.L. (1994)
 J. Biol. Chem., 269, 28871–28877.
- 73. *Malyan, A.N., Allison, W.S.* (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1554**, 153–158.
- Nelson, N., Nelson, H., Racker, E. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6606– 6510.
- 75. *Mitchell, P., Moyle, J.* (1971) Bioenergetics, **2**, 1–11.
- Malyan, A.N., Kuzmin, A.N, Vitseva, O.I. (1990) Photosynthetica, 24, 613–622.
- 77. Cappelini, P., Turina, P., Fregni, V., and Melandri B.A. (1997) Eur. J. Biochem., **248**, 496–506.
- Мальян А.Н., Вицева О.И. (1987) Физиол. биохим. культ. растений, 19, 456–461.
- 79. *Menz, R.I., Walker, J.E., Leslie, A.G.* (2001) Cell, **106**, 331–341.
- Kabaleeswaran, V., Puri, N., Walker, J.E., Leslie, A.G., Mueller, D.M. (2006) EMBO J., 25, 5433–5442.
- Malyan, A.N. (2003) Biochem. Biophys. Acta, 1607, 161–166.
- 82. *Мальян А.Н., Вицева О.И.* (2001) Биохимия, **66**, 505–510.
- 83. *Мальян А.Н.* (2013) Докл. РАН, **459**, 109–111.
- Milgrom, Y.M., Cross, R.L. (1993) J. Biol. Chem., 268, 23179–23185.
- Murataliev, M.B.(1992) Biochem., 31, 12885–12892.
- 86. Пронин А.С., Мальян А.Н. (2009) Биохимия, **74**, 956–962.
- 87. Rectenwald, D., Hess, D.O. (1977) FEBS Lett., **76**, 25–28.
- Wise, J.G., Senior, A.E. (1985) Biochemistry, 24, 6949–6954.
- 89. *Булыгин В.В., Мильгром Я.М.* (2010). Биохимия, **75**, 400–410.
- 90. Senior, A.E., Lee, R.S.F., Al-Shavi, M.K., Weber, J. (1992) Arch. Biochem. Biophys., 297, 340–344.

- 91. Weber, J., Bowman, S., Wilke-Mounts, S., Senior, A.E. (1995) J. Biol. Chem., 270, 21045–21049
- Ono, S., Hara, K.Y., Hirao, J., Matsui, T., Noji, H., Yoshida, M., Muneyuki, E. (2003) Biochim. Biophys. Acta, 1607, 35–44.
- 93. Jault, J.-M., Matsui, T., Jault, F.M., Kaibara, C., Muneyuki, E., Yoshida, M., Kagawa, Y., Allison, W.S. (1995) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 34, 16412–16418.
- 94. Richard, P., Pitard, B., Rigaud, J.-L. (1995) J. Biol. Chem., 270, 21571–21578.
- 95. Matsui T., Muneyuki E., Honda M., Allison W.S., Dou C., Yoshida M. (1997) J. Biol. Chem., 272, 8215–8221.
- 96. Dou, C., Grodsky, N.B., Matsui, T., Yoshida, M., Allison, W.S. (1997) Biochemistry, 36, 3719–3727.
- Jault, J.M., Paik, S.R., Grodsky, N.B., Allison, W.S. (1994) Biochem. 33, 14979–14985.
- 98. Amano T., Matsui T., Muneyuki E., Hara K., Yoshida M. (1999) Biochem. J., 343, 135–138.
- Possmayer F.E., Hartog A.F., Berden J.A., Graeber P. (2000) Biochim. Biophys. Acta, 1456, 77–98.
- 100. Possmayer F.E., Hartog A.F., Berden J.A., Graeber P. (2001) Biochim. Biophys. Acta, **1510**, 378–400.
- 101. *Malyan, A.N.* (2005) Biochemistry (Moscow), **70**, 1245–1250.
- 102. *Richard, P.* (1996) Biochim. Biophys. Acta, **1275**, 141–144.
- 103. Du, Z., Boyer, P.D. (1990) Biochemistry, **29**, 402–407.
- 104. *Harris, D.A., Slater, E.C.* (1975) Biochim. Biophys. Acta, **387**, 335–348.
- 105. Malyan, A.N. (2006) Photosynth. Res., 88, 9–18.
- 106. Labahn, A., Graeber, P. (1993) Biochim. Biophys. Acta, 1144, 170–176.

A.H.M	альян
-------	-------

- 107. *Malyan, A.N.* (2007) Biochemistry (Moscow), **72**, 728–734.
- 108. *Malyan, A.N.* (2010) Photosynth. Res., **105**, 243–248.
- 109. Shigalova, T., Lehmann, U., Krevet, M., Strotmann, H.(1985) Biochim. Biophys. Acta, **809**, 57–65.
- 110. Falson, P., Goffeau, F., Boutry, M., Jaoult, J.M. (2004) Biochim. Biophys. Acta 1658, 133–140.
- 111. *Malyan, A.N.* (2010) Biochemistry (Moscow), **75**, 81–84.
- 112. Чернавский Д.С., Чернавская Н.М. (1999). Белок – машина. Биологические макромолекулярные конструкции. Москва: Издательство Московского университета, 256 с.
- 113. Ленинджер А. (1976) Биохимия. Москва: Мир, 957 с.
- 114. Wise, J.G. (1990) J. Biol. Chem., 265, 10403-10409.
- 115. Schaefer, H.-J., Mueller, H.W., Dose, K. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, 1113–1118.
- 116. Weber, J., Lee, R.S., Grell, E., Senior, A.E. (1992) J. Biol. Chem., 267, 1712–1718.

- Bandyopadhyay, S., Ren., H., Wang, C.S., Allison, W.S. (2002) Biochem., 41, 3226–3234.
- Maggio, M.B., Pagan, J., Personage, D., Hatch, L., Senior, A. (1987) J. Biol. Chem., 262, 8981–8984.
- 119. Le, N.P., Omote, H., Wada, Y., Al-Shawi, M.K., Nakamoto, R.K., Futai, M. (2000) Biochemistry, 39, 2778–2783.
- 120. Kanazawa, H., Noumi, T., Matsuoka, I., Hirata T., Futai, M. (1984) Arch. Biochem. Biophys., 228, 258–269.
- 121. Wise, J.G., Latchney, L.R., Ferguson, A.M., and Senior, A.E. (1984) Biochemistry, **23**, 1426–1432.
- 122. Mnatsakanyan, N., Hook, J.A., Quisenberry, L., Weber, J. (2009) J. Biol. Chem. 284, 26519–26525.
- 123. Kohori, A., Chiwata, R., Hossain, M.D., Furuike, S., Shiroguchi, K., Adachi, K., Yoshida, M., Kinosita, K. Jr. (2011) Biophys. J., 101, 188–195.
- 124. Usukura, E., Suzuki, T., Furuike, S., Soga, N., Saita, E.I., Hisabori, T., Kinosita, K. Jr., Yoshida, M. (2012) J. Biol. Chem., 287, 1884–1891.