

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Клишин Сергей Сергеевич

**РАЗДЕЛЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ЦИКЛА ЦИТОХРОМ bc_1 -КОМПЛЕКСА
В ХРОМАТОФОРАХ *Rhodobacter capsulatus* НА ОТДЕЛЬНЫЕ СТАДИИ
С ПОМОЩЬЮ ИОНОВ ЦИНКА**

03.00.04-биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2005

Работа выполнена в отделе биоэнергетики НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, а также на кафедре биофизики Биологического факультета Оснабрюкского университета (ФРГ).

Научные руководители: академик РАН В.П. Скулачёв

кандидат биологических наук
А.Л. Мулкиджанян

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор А.А. Булычев

доктор биологических наук
Б.Н. Иванов

Ведущая организация: Институт электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

Защита состоится «30» мая 2005 года в 14:00 в аудитории ББА на заседании диссертационного совета Д.501.001.71 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан

«28» апреля 2005 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

 М.В. Медведева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Цитохром **bc₁**-комплекс (убихинол: цитохром *c* оксидоредуктаза, ЕС 1.10.2.2.) является ключевым компонентом энергопреобразующих электрон-транспортных цепей. Этот фермент занимает центральное место в энергетическом обмене как митохондрий (где он ещё известен как комплекс Ш), так и большинства бактерий. Цитохром **bc₁**-комплекс представляет собой димер, каждый мономер которого включает в себя один цитохром *b* с двумя темами - высокопотенциальным гемом **b_h** (со среднеточечным окислительно-восстановительным потенциалом при pH 7,0 (E_m^7) равным 50 мВ), и низкопотенциальным гемом **b_l** ($E_m^7 = -100$ мВ), один [2Fe-2S] железосерный белок Рiske (E_m^7 около 300 мВ), один цитохром *c*₁ (E_m^7 около 300 мВ) и варьирующее количество субъединиц разной молекулярной массы, не содержащих простетических групп. Цитохром **bc₁**-комплекс окисляет молекулы убихинола и восстанавливает цитохром *c* (в фототрофных бактериях цитохром *c*₂), сопрягая эту редокс-реакцию с генерацией мембранного потенциала (т.е. трансмембранной разности электрохимических потенциалов ионов водорода), используемого для синтеза АТФ и транспорта метаболитов. В последнее время цитохром **bc₁**-комплекс привлекает к себе интерес ещё и как возможный регулятор образования активных форм кислорода.

В цитохром **bc₁**-комплексе различают два хинон-связывающих каталитических центра (сайта), расположенных по разные стороны мембраны. По современным представлениям убихинол окисляется у положительно заряженной *p*-стороны мембраны в сайте **Q_o**, образуемому на стыковочной поверхности белка Рiske с цитохромом *b*. Пути двух электронов, высвобождающихся во время этой реакции, расходятся. Первый электрон восстанавливает железосерный кластер белка Рiske. Редокс-активный домен белка Рiske (FeS домен) подвижен и поворачивается на 60° чтобы передать электрон цитохрому *c*₁, у которого электрон затем забирает мобильный цитохром *c*. Второй электрон поступает на гем **b_h**, откуда он переносится поперек мембраны сперва на тем **b_h**, а затем в хинол-связывающий сайт **Q_i** у противоположной, отрицательно заряженной *n*-стороны мембраны. Восстановление молекулы убихинона в сайте **Q_i** приводит к образованию аниона семихинона Q. Окисление следующего убихинола в сайте **Q_o** дает убихинол **QH₂** в сайте **Q_i**. Образование одной молекулы убихинола в сайте **Q_i** в результате окисления двух молекул убихинола в сайте **Q_o** (т.н. *Q*-цикл П.Митчелла) повышает эффективность преобразования энергии, поскольку образование убихинола в сайте **Q_i** связано с захватом двух протонов с «-стороны

мембраны, а окисление убихинола в сайте Q_o сопровождается выбросом двух протонов с р-стороны мембраны. Механизм электрон-протонного сопряжения и природа электрогенных стадий в цитохром bc_1 -комплексе остаются до сих пор неясными и заслуживают изучения.

В 1967 году Скулачёв с соавторами впервые показали, что ионы Zn^{2+} ингибируют цитохром bc_1 -комплекс. Добавление микромолярных концентраций ионов Zn^{2+} к митохондриям увеличивало степень восстановленности цитохрома b и уменьшало степень восстановленности цитохрома c . Ингибирующее действие цинка обращалось добавлением ЭДТА.

В настоящей работе исследовалось действие ионов Zn^{2+} на простейший трехсубъединичный цитохром bc_1 -комплекс фототрофных бактерий *Rhodobacter capsulatus*. Фермент исследовался в нативных мембранных везикулах (хроматофорах). Наличие фотосинтетических реакционных центров (РЦ) позволяло запускать фермент вспышкой света. То обстоятельство, что каротиноидные пигменты светособирающих комплексов *Rb. capsulatus* являются природными электрохромными индикаторами трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$), давало возможность оптическими методами регистрировать стадии трансмембранного переноса электрического заряда и изучать их связь с редокс превращениями цитохромов в микро- и миллисекундной временной шкале измерений.

Обратимость ингибирующего действия цинка позволяла надеяться, что его малые концентрации могут быть использованы для «притормаживания» индуцированных вспышками реакций в цитохром bc_1 -комплексе *Rb. capsulatus* и выявления отдельных стадий каталитического цикла без нарушения целостности работы фермента.

Цель настоящей работы. Цель настоящей работы состояла в изучении механизма сопряжения окислительно-восстановительных (редокс) реакций в цитохром bc_1 -комплексе *Rb. capsulatus* как друг с другом, так и с генерацией мембранного потенциала. Для этого было изучена работа цитохром bc_1 -комплекса в присутствии малых концентраций ионов Zn^{2+} .

Научная новизна работы. Для цитохром bc_1 -комплекса впервые предложена экспериментальная система, позволяющая, в присутствии малых концентраций ионов Zn^{2+} , параллельно следить, используя метод импульсной спектрофотометрии, за редокс реакциями цитохромов b и c , генерацией $\Delta\psi$ и переносом протонов. Предложенная методика позволяет изучать цитохром bc_1 -комплекс в оптимальных для его функционирования окислительно-восстановительных условиях.

В работе показано отсутствие кинетического сопряжения между быстрым окислением убухинола, приводящим к трансмембранному переносу электрона к тему b_h , и более медленными восстановлением цитохрома c_1 , генерацией $\Delta\psi$ и выбросом протона внутрь хроматофоров. Неэлектрогенность трансмембранного переноса электронов в цитохром bc_1 -комплексе свидетельствует о способности белка электростатически компенсировать перенос заряда на расстояние около 20 Å. Выявленная корреляция между восстановлением цитохрома c_1 генерацией $\Delta\psi$, выбросом протона внутрь хроматофора и окислением гема b_h позволила предложить модель работы цитохром bc_1 -комплекса, согласующуюся с экспериментальными данными.

Практическое значение работы. Полученные результаты значительно расширяют современные представления о свойствах и механизме функционирования цитохром bc_1 -комплекса *Rb. capsulatus*, а данные по ингибированию отдельных кинетических стадий ионами Zn^{2+} могут быть полезны при изучении этого фермента в других организмах. В данной работе предложены новые методические подходы для исследования работы цитохром bc_1 -комплекса в условиях близких к физиологическим. Полученные результаты могут быть использованы при изучении роли цитохром bc_1 -комплекса в регуляции образования активных форм кислорода.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на научном семинаре отдела биоэнергетики НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ 15 апреля 2004 г., а также на 12-ом Международном конгрессе по фотосинтезу (Брисбен, Австралия, 2001г.), 12-ой Европейской конференции по биоэнергетике (Аркашон, Франция, 2002г.), 11-ом Международном симпозиуме по фототрофным прокариотам (Токио, Япония, 2003), 13-ой Европейской конференции по биоэнергетике (Пиза, Италия, 2004), 13-ом Международном конгрессе по фотосинтезу (Монреаль, Канада, 2004), Международной конференции «Российская биоэнергетика: От молекул к клетке» (Москва, 2005).

Публикации. Результаты диссертационной работы изложены в трёх статьях и восьми тезисах.

Структура диссертации. Диссертация, изложенная на 146 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, состоящего из 3-х отечественных и 169 иностранных источников цитирования. Работа содержит 2 таблицы и иллюстрирована 45 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Материалы и методы.

1.1. Культивирование *Rhodobacter capsulatus*. В настоящей работе использовались пурпурные фототрофные α -протеобактерии *Rhodobacter capsulatus*. Штам В10 (дикий тип) был любезно предоставлен профессором Джексоном (Университет Бирмингем, Великобритания). Клетки выращивались фотогетеротрофно в анаэробных условиях (Lascelles, 1959). Среда культивирования содержала: 0,4% малата, 10 мМ KH_2PO_4 , 0,1% $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, 0,2 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,075 г/л CaCl_2 , 0,012 г/л FeSO_4 , 0,02 г/л ЭДТА, 1,59 мг/л MnSO_4 , 0,04 мг/л $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, 0,74 мг/л NaMoO_4 , 2,8 мг/л H_3BO_3 , 0,24 мг/л ZnSO_4 , 0,1 мг/л биотина, 1 мг/л тиамина, 1 мг/л никотиновой кислоты; pH 6,8. Незадолго до достижения конца логарифмической фазы роста клетки осаждались центрифугированием (7000g, 35 мин., 4 °C).

1.2 Получение хроматофоров. Осажденные клетки ресуспендировали в 500–700 мл буфера 1, содержавшего 30мМ HEPES, 2 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl, и вновь осаждали центрифугированием (12000g, 35 мин., 4 °C). Затем клетки ресуспендировали в буфере 1, дополненном 10% сахарозой, и добавляли несколько крупинок ДНКазы. С этого момента все процедуры с суспензией выполнялись при 0 °C (на льду) и в темноте. Суспензия пропусклась через Френч-пресс (11000–16000 psi), затем крупные клеточные обломки осаждали центрифугированием (20000g, 30 мин., 4 °C). Супернатант центрифугировался (120000g, 120 мин., 4 °C). Осажденные хроматофоры ресуспендировались в буфере 1, дополненном сахарозой (200 мг/л). Получение хроматофоров замораживались в жидком азоте и хранились при -80 °C.

1.3 Оборудование для импульсной спектrophотометрии.

Источником мониторингового света служила галогеновая лампа мощностью 200 Вт. Мониторный свет с необходимой длиной волны выделялся либо с помощью монохроматора (Amko Metrospek), либо с помощью интерференционных фильтров (SCHOTT), помещаемых непосредственно перед кюветным отделением. Для возбуждения использовалась ксеноновая лампа-вспышка с полувременем 10 мкс, оборудованная оптическим фильтром, отсекающим свет с $\lambda < 780$ нм (RG 780, SCHOTT). Для регистрации изменений оптической плотности использовался фотоэлектронный умножитель (ФЭУ) марки Thorn EMI 9801B, защищенный от возбуждающего света двумя фильтрами BG 39 (SCHOTT). Избыточное возбуждение

пробы мониторным светом предотвращалось шторкой, установленной перед кюветным отделением. Шторка открывалась за 400 мс до вспышки возбуждающего света.

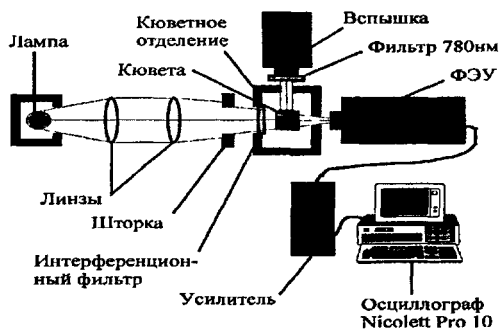


Рис.1. Схема установки для импульсной спектрофотометрии.

Сигнал с ФЭУ поступал на дифференциальный усилитель Tektronix AM502, усиливался в 100 раз и затем регистрировался осциллографом Nicolet Pro10, совмещенным с компьютером, осуществлявшим накопление и усреднение сигналов.

1.4. Среда и условия измерений.

Эксперименты проводились в стеклянной кювете объёмом 12 мл, оптический путь составлял 2 см. Концентрация бактериохлорофилла в среде измерений составляла 8-12 мкМ. Обычно в пробе присутствовали 25 мМ рН-буфера HEPES, 5 мМ $MgCl_2$ и 2 мМ KCN (для подавления терминальных оксидаз). В качестве высокопотенциального редокс-медиатора добавляли 5 мкМ N',N',N,N' -тетраметил-*p*-фенилендиамина (ТМПД), а в качестве низкопотенциального редокс-медиатора присутствовал метиленовый синий (МС) в концентрации 2-8 мкМ. Окислительно-восстановительные условия задавались комбинацией редокс буфера и редокс медиаторов. В качестве редокс-буфера использовали сукцинат-фумаратную систему с различным отношением сукцината/фумарата калия (Каменский и др., 1975). Для создания анаэробии добавлялись 0,08 мкг/мл глюкозооксидазы (171,000 единиц/г), 0,08 мкг/мл каталазы (2,350 единиц/г) и 10 мМ глюкозы. В работе использовались реактивы фирмы Sigma-Aldrige.

При регистрации изменений рН внутри хроматофоров использовались препараты, отмытые от буфера с помощью ультрацентрифугирования. Изменения рН внутри хроматофора регистрировались с помощью амфифильного красителя нейтрального

красного. Присутствие 5 мМ рН-буфера HEPES в пробе позволяло селективно регистрировать, при длине волны 545 нм, изменения оптического поглощения красителя внутри хроматофоров в ответ на выброс протонов цитохром bc_1 -комплексом. Измерение $\Delta\psi$ регистрировалось по изменению поглощения каротиноидных пигментов при длине волны 522 нм. Редокс превращения гема b_h регистрировались как разница оптического поглощения при 561 нм - 570 нм и рассчитывались как $\Delta A_{561-570} = A_{561} - 1,08 \times A_{570}$ (учёт вклада окисленного первичного донора РЦ P_{870}^+) - $0,14 \times \Delta A_{552-570}$ (учёт спектрального вклада цитохрома c_1 на 561 нм) - $0,01 \times A_{522}$ (учёт электрохромного сдвига каротиноидов). Измерение редокс превращений цитохрома c_1 регистрировалось как разница поглощения при 552 нм - 570 нм и рассчитывалось соответственно как $\Delta A_{552-570} = A_{552} - 1,34 \times A_{570} - 0,05 A_{522}$. Количество накоплений сигналов с ФЭУ при измерении генерации $\Delta\psi$ составляло 8, а при редокс превращений гема b_h и цитохрома c_1 - 16, в опытах с использованием слабой вспышки оно составляло 16 и 32, соответственно. Концентрация РЦ определялась в присутствии миксотиазола по изменению оптического поглощения P_{870} при $\lambda = 604$ нм в ответ на 3 вспышки возбуждающего света с интервалом 50 мс (Mulikidjanian et al., 1991). Концентрация цитохром bc_1 -комплекса определялась в ответ на 2 последовательные вспышки возбуждающего света (интервал - 100 мс) по изменению оптического поглощения $\Delta A_{561-570}$ в присутствии антимицина А.

2. Результаты.

В окислительных условиях, когда весь убихинон в мембране окислен, во восстановление гема b_h происходит быстрее, чем генерация $\Delta\psi$ (Gopta et al., 1998). Когда убихинон в мембране наполовину восстановлен, т.е. в условиях, которые близки к нативным, индуцированные вспышкой редокс превращения гема b_h спектрально не разрешимы, т.к. гем b_h окисляется быстрее, чем восстанавливается. Кинетику восстановления гема b_h можно разрешить, заблокировав его окисление антимицином А. Однако, необратимо связавшись с цитохром bc_1 -комплексом, антимицин А позволяет перенести электрон только до гема b_h , прерывая, таким образом, каталитический цикл. В предварительных экспериментах нами было обнаружено, что ионы Zn^{2+} замедляли окисление гема b_h , делая его редокс превращения видимыми. Таким образом, в присутствие ионов цинка можно было изучать корреляцию между электрогенезом и редокс реакциями цитохрома b . Предварительные эксперименты показали, что ионы Zn^{2+} образовывали комплексы с ферроцианидом калия. Это делало невозможным использование такого

традиционного редокс буфера как ферроцианид/феррицианид калия. Поэтому в данной работе мы воспользовались отработанной Константиновым и соавторами методикой использования пары сукцинат/фумарат калия в качестве редокс буфера. Варьируя отношение сукцинат/фумарат, можно было моделировать в пробе различные окислительно-восстановительные условия. В данной работе эксперименты производились либо в анаэробной системе при соотношении сукцинат/фумарат 1:20, либо в аэробных условиях при соотношении сукцинат/фумарат 1:1. В ответ на вспышку света цитохром bc_1 -комплекс запускался окислением цитохрома c .

2.1. Индуцируемые вспышкой реакции в цитохром bc_1 -комплексе *Rb. capsulatus*.

На рис. 2А показаны индуцированные вспышкой редокс превращения гема b_h в различных условиях. В отсутствие специфических ингибиторов, когда убихинон в мембране был наполовину восстановлен, редокс превращения гема b_h при 561-570 нм практически не были видны (кривая 1 на рис. 2А). В присутствии антимицина А, блокирующего центр Q_0 , гем b_h восстанавливался за 2 мс (кривая 2 на рис. 2А).

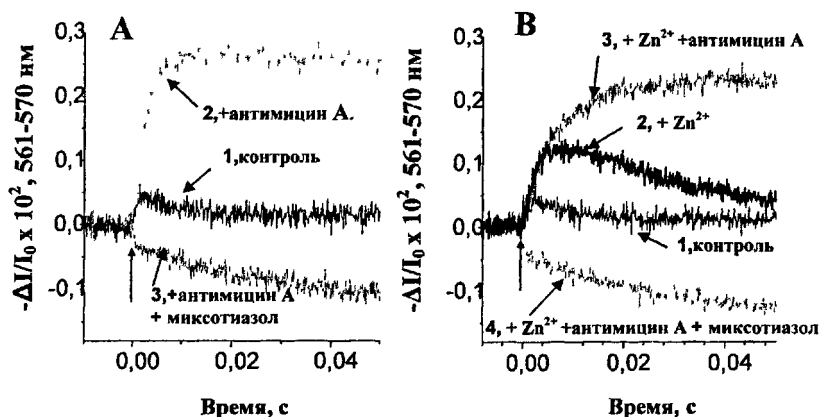


Рис.2. Кинетики индуцированных вспышкой редокс-превращений гема b_h в хроматофорах *Rb. capsulatus*. На рисунке показаны редокс превращения гема b_h в отсутствие ионов цинка (А) и в присутствии 50 мкМ $ZnSO_4$ (В).

При добавлении поверх антимицина А ингибитора центра Q_0 миксотиазола регистрировались небольшие абсорбционные изменения отрицательного знака (кривая 3, рис. 2А), обусловленные, как показано Шинкаревым и соавторами,

перераспределением электронов между темными b_h и b_l в ответ на вспышку света (Shinkarev et al., 2001).

Индуклируемые вспышкой абсорбционные изменения гема b_h при 560-570 нм становились разрешимыми в присутствии ионов цинка (кривая 2 на рис. 2B). Восстановление гема b_h в присутствии цинка происходило с характерным полувременем $t_{1/2} = 1-2$ мс, а его последующее окисление - за 10-20 мс.

Восстановление только половины гема b_h было связано с тем, что другая половина, по литературным данным (Siedow et al., 1978), должна была быть в форме b_h^{150} с E_m^7 около 150 мВ и, соответственно, восстановленной уже до вспышки в условиях наших опытов. Антимидин А подавляет форму b_h^{150} (Crofts, 2004), поэтому в его присутствии гема b_h на вспышку восстанавливалось больше.

На рис. 3 показана генерация $\Delta\psi$ хроматофорами *Rb. capsulatus* в ответ на вспышку света. Кинетика ответов содержала быструю и медленную компоненты. Быстрая компонента со временем < 1 мс отражала реакции в РЦ, а именно перенос электрона с P_{870} на первичный хинон Q_A , последующий перенос электрона с Q_A^- на Q_B и восстановление P_{870}^+ цитохромом c_1 . При этом через мембрану переносился один электрический заряд. Медленная компонента со временем > 1 мс отражала работу цитохром bc_1 -комплекса. Когда убихинон в мембране был наполовину восстановлен, полувремя ($t_{1/2}$) этой компоненты было около 3 мс. Эта фаза частично ингибировалась антимицином А (кривая 2 на рис. 3А) и полностью блокировалась миксотиазолом (кривая 3 на рис. 3А). Поскольку соотношение РЦ и цитохром bc_1 -комплексов в препарате хроматофоров постоянно, амплитуду генерации $\Delta\psi$ в цитохром bc_1 -комплексе можно было нормировать по амплитуде разделения зарядов в РЦ.

Добавка ионов Zn^{2+} замедляла генерацию $\Delta\psi$ (кривая 2 на рис. 3В). Полувремя $t_{1/2}$ для генерации $\Delta\psi$ в присутствии 50 мкМ Zn^{2+} составляло около 10 мс (кривая 2 на рис. 3С). При этом амплитуда электрогенной реакции в цитохром bc_1 -комплексе не отличалась от контрольной, т.е. фермент оставался функционально активным. Добавление 5 мкМ миксотиазола полностью ингибировало генерацию $\Delta\psi$ цитохром bc_1 -комплексом, поэтому разностные кривые $-/+ 5$ мкМ миксотиазол, представленные на рис. 3С и 3D, отражают вклад цитохром bc_1 -комплекса в генерацию $\Delta\psi$ в ответ на вспышку.

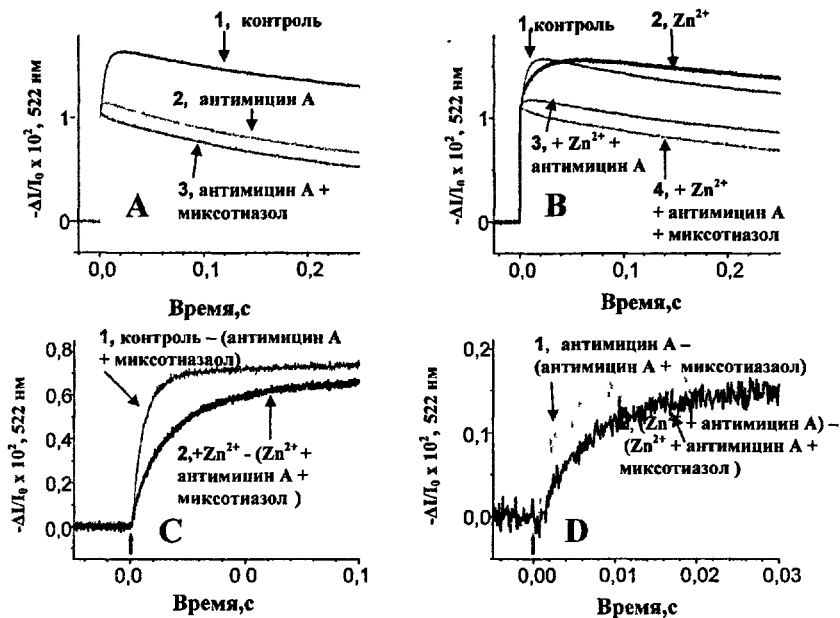


Рис.3. Индуцированная вспышкой генерация $\Delta\psi$ хроматофорами *Rb. capsulatus*.

На рисунках показаны кривые изменений $\Delta\psi$ в отсутствии (А) и присутствии (В) 50 мкМ ZnSO_4 . Разностные кривые $-/+$ 5 мкМ миксотиазол, 5 мкМ антимицин А представлены на рис(С), а аналогичные кривые для проб, исходно содержащих 5 мкМ антимицин А, приведены на рис (D)

Данные на рис. 2В и 3D показывают, что ионы Zn^{2+} замедляли реакции в цитохром bc_1 -комплексе и тогда, когда Q_i -сайт был заблокирован антимицином А. Вероятнее всего, цинк влиял на реакции в Q_o -сайте. Это предположение подтверждается рентгеноструктурными данными Берри и соавторов (2000), показавших, что в митохондриальном цитохром bc_1 -комплексе цинк связывался неподалеку от центра Q_o , между цитохромами b и c_1 . Лигандами при этом служили D-253, E-255 и H-268 цитохрома b и H-121 цитохрома c_1 (см. также рис. 11).

2.2. Зависимость редокс реакций гема b_h и генерации $\Delta\psi$ цитохром bc_1 -комплексом от концентрации Zn^{2+} .

На рис. 4 показаны зависимости амплитуд реакций в цитохром bc_1 -комплексе от концентрации $ZnSO_4$, изменявшейся в интервале от 0 до 600 мкМ. Относительное количество восстанавливающегося на вспышку гема b_h увеличивалось в интервале концентраций 0 - 25 мкМ Zn^{2+} (кружки на рис. 4) и далее стабилизировалось на уровне, примерно соответствующем половине гема b_h , восстанавливающегося в присутствии антимицина А (треугольники на рис. 4). Относительное количество гема b_h , восстанавливающегося в присутствии антимицина А, не менялось до 100 мкМ Zn^{2+} , но уменьшалось при больших концентрациях цинка. Относительная амплитуда генерации $\Delta\psi$ зависела от концентрации Zn^{2+} аналогичным образом, падая при концентрациях $ZnSO_4$ больших 100 мкМ (квадраты на рис. 4).

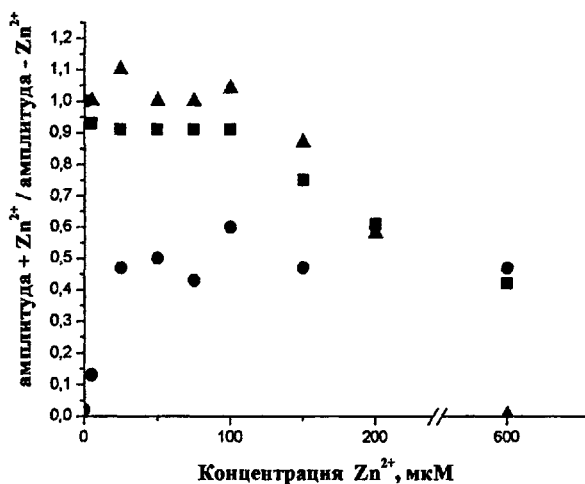


Рис. 4. Зависимость относительной амплитуды реакций в цитохром bc_1 -комплексе от концентрации ионов Zn^{2+} .

По оси ординат отложены значения относительной амплитуды $(+Zn^{2+}/-Zn^{2+})$. Символы: квадраты, ■ - генерация $\Delta\psi$ в цитохром bc_1 -комплексе в отсутствие антимицина А; кружки, ● - восстановление гема b_h в отсутствие антимицина А; треугольники, ▲ - восстановление гема b_h в присутствии антимицина А.

Резкое падение амплитуды реакций в цитохром bc_1 -комплекс при концентрациях цинка более 100 мкМ было, видимо, вызвано неспецифическим связыванием ионов Zn^{2+} .

В силу этого, в данной работе мы сосредоточились на исследовании эффектов, наблюдавшихся при концентрациях Zn^{2+} менее 100 мкМ.

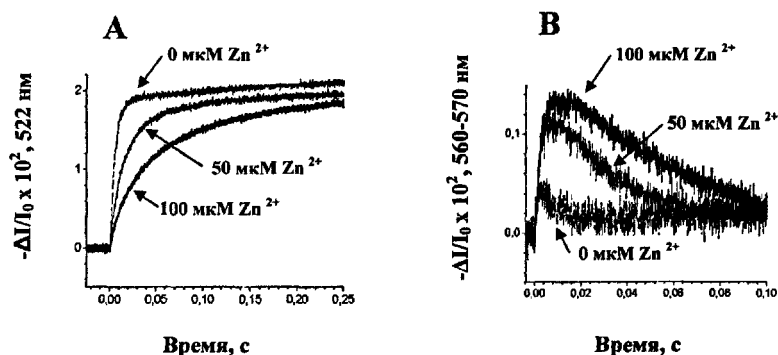


Рис.5. Зависимость скорости реакций в цитохром bc_1 -комплексе от концентрации ZnSO_4 .

На рис. 5 представлены кинетики генерации $\Delta\psi$ (A) и редокс-превращений гема b_h (B) при различных концентрациях цинка. С увеличением концентрации цинка генерация $\Delta\psi$ замедлялась (рис. 5A). Аналогичное увеличение концентрации цинка практически не влияло на скорость восстановления гема b_h (рис. 5B), замедляя в то же время его окисление. Окисление гема b_h коррелировало при этом с генерацией $\Delta\psi$ (ср. скорость спада сигнала на рис. 5B со скоростью нарастания сигнала на рис. 5A). Как следует из рис. 5, индуцированное вспышкой восстановление гема b_h в присутствии 50-100 мкМ Zn^{2+} было на порядок быстрее, чем генерация $\Delta\psi$.

2.3 Действие Zn^{2+} на редокс-реакции цитохромов c.

Редокс-превращения цитохромов c в ответ на вспышку показаны на рис. 6. Поскольку цитохромы c_1 и c_2 имеют близкие максимумы поглощения при 552 нм и 550 нм, соответственно, то при 552 нм мог измеряться только общий ответ цитохромов c_1 и c_2 (c_{06}).

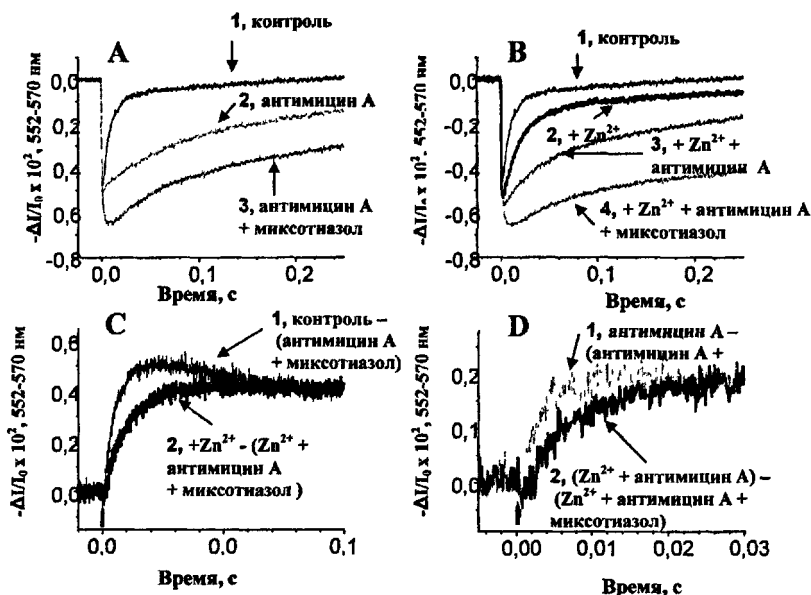


Рис.6. Индуцированные вспышкой редокс реакции цитохромов с.

На рисунках показаны кинетики восстановления цитохрома c_{66} в отсутствие (А) и присутствии (В) 50 мкМ ZnSO_4 . Разностные кривые $\pm 5 \text{ мкМ}$ миксотиазол, 5 мкМ антимицин А представлены на рис. (С), а аналогичные кривые для проб, исходно содержащих 5 мкМ антимицин А, приведены на рис. (D).

На рис. 6А показаны редокс-превращения цитохромов с, где кинетически не разрешаемое уменьшение оптического поглощения отражает их быстрое окисление в ответ на вспышку, а медленная фаза, в отсутствии ингибиторов имеющая $t_{1/2} = 10 \text{ мс}$, соответствует их восстановлению.

В отсутствие ингибиторов цитохром c_{66} восстанавливался почти полностью (кривая 1 на рис. 6А). В присутствии антимицина А (кривая 2 на рис. 6А) это восстановление было частичным. При добавке миксотиазола после антимицина А (кривая 3 на рис. 6А) восстановление цитохрома c_{66} в миллисекундной шкале не наблюдалось.

Цитохромы c_1 и c_2 находятся в быстром редокс-равновесии с друг другом ($< 100 \text{ мкс}$), поэтому редокс изменения цитохрома c_{66} в ответ на вспышку отражали три основных реакции: перенос электрона с цитохромов c_1 и c_2 на окисленный вспышкой P_{870}^+ ($< 200 \text{ мкс}$, Dutton and Prince, 1978), быстрый перенос электрона с восстановленного FeS-домена на цитохром c_1 ($< 100 \text{ мкс}$, Sadoski et al., 2000) и опосредованный движением FeS-домена от цитохрома c_1 к центру Q_0 и обратно перенос электрона от убихинола в центре Q_0 к цитохрому c_1 за миллисекунды (ре-восстановление цитохрома c_1). Миксотиазол не оказывает ингибирующего действия на первые две

реакции, но блокирует окисление убихинола. Поэтому различия в кинетиках $-/+$ миксотиазол на рис. 6С отражают кинетику переноса электрона подвижным FeS-доменом белка Риска от убихинола в сайте Q_0 к цитохрому c_1 . Дифференциальные кинетики $-/+$ миксотиазол (см рис. 6D), полученные при добавлении миксотиазола поверх антимицина А, отражают кинетику переноса электрона от убихинола в сайте Q_0 к цитохрому c_1 в присутствии антимицина А. Разностные кинетики на рис. 6С и 6D показывают, что ионы Zn^{2+} замедляли ре-восстановление цитохрома c_{66} как в отсутствие, так и в присутствии антимицина А. Сравнение кинетик генерации $\Delta\psi$ (рис. 3) и восстановления c_{66} (рис. 6) говорит об их корреляции между собой.

2.4. Действие Zn^{2+} при различных значениях pH.

Действие Zn^{2+} на генерацию $\Delta\psi$ и редокс реакции в цитохром bc_1 -комплексе было исследовано в интервале pH от 6,0 до 9,5 (см. рис. 7 и 8). И в кислых, и в щелочных условиях наблюдалось снижение ингибирующего действия Zn^{2+} по сравнению с обычными условиями измерений при pH 7,5. На рис. 8 показана pH-зависимость выраженности ингибирующего эффекта ионов Zn^{2+} на генерацию $\Delta\psi$.

На рис. 7 А-С представлены кинетики исследованных реакций при pH = 6,0. Цинк в концентрации 50 мкМ практически не оказывал никакого влияния ни на генерацию $\Delta\psi$, ни на редокс реакции гема b_h и цитохрома c_{66} . Можно предположить, что группы, ответственные за связывание цинка, были протонированы при низких значениях pH, так что ион Zn^{2+} не мог связаться с цитохром bc_1 -комплексом. Исчезновение ингибирующего действия Zn^{2+} происходило с pK около 7,0 что согласуется с литературными данными для митохондриального цитохром bc_1 -комплекса ингибирующегося Zn^{2+} с pK 7,2 (Link and von Jagow, 1995).

Можно предположить, что по аналогии с действием цинка на РЦ *Rb. sphaeroides* (Paddock et. al. 2003), уменьшение ингибирующей активности ионов Zn^{2+} при понижении pH связано с протонированием гистидиновых остатков, служащих лигандами Zn^{2+} в обоих случаях.

Как показано на рис.7 D-F, при увеличении pH до 9,5 ингибирующее действие цинка также уменьшалось. Надо отметить, что кинетики генерации $\Delta\psi$ цитохром bc_1 -комплексом и восстановления цитохрома c_{66} замедлялись в щелочных условиях даже без цинка, напоминая кинетики, регистрируемые в присутствии Zn^{2+} при нейтральных значениях pH. По-видимому, дефицит протонов в щелочных условиях

начинал лимитировать цитохром bc_1 -комплекс, и по этой причине ингибирующее действие цинка не проявлялось на фоне общего замедления.

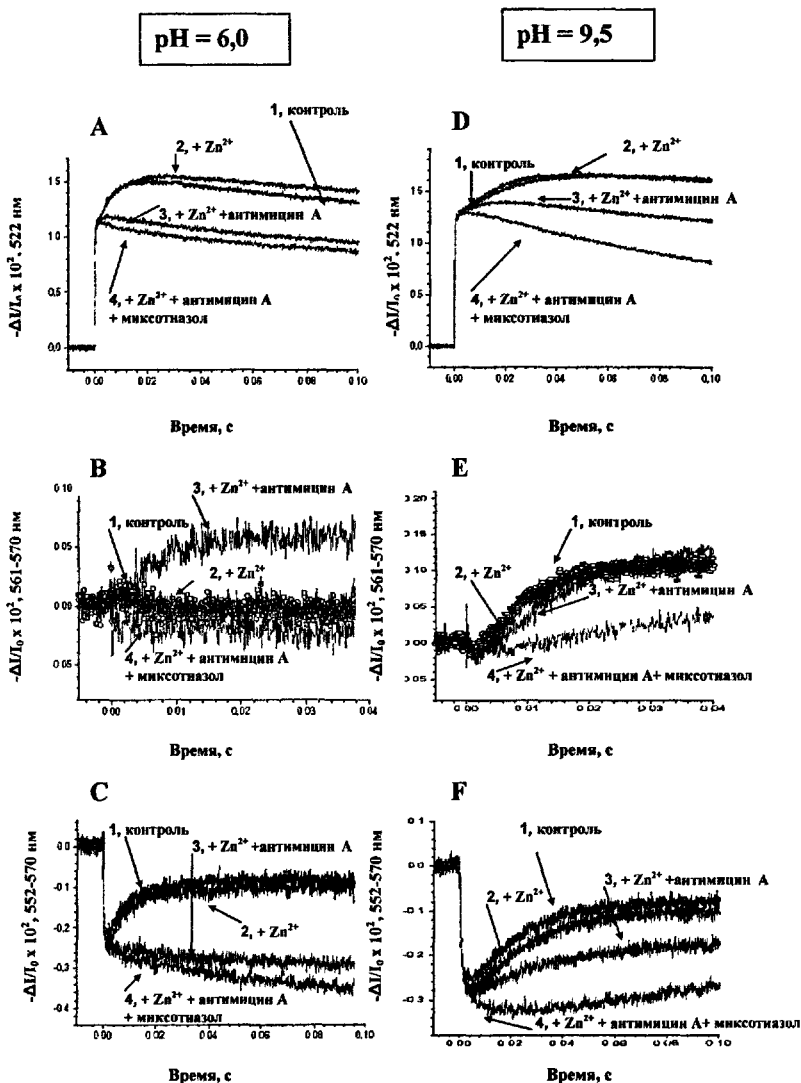


Рис.7. Действие $50 \mu\text{M Zn}^{2+}$ на цитохром bc_1 -комплекс при pH 6,0 и 9,5.

Генерация $\Delta\Psi$ цитохром bc_1 -комплексом при pH=6,0 (A) и pH=9,5 (D), редокс превращения гема b_h при pH=6,0 (B) и при pH=9,5 (E), окислительно-восстановительные реакции цитохрома c_{oo} при pH=6,0 (C) и при pH=9,5 (F)

При $\text{pH} = 9,5$ восстановление гема b_h можно было наблюдать в отсутствие как цинка, так и антимицина А (кривая 1 на рис. 7Е). Скорость восстановления гема b_h была в 5 раз выше скорости генерации $\Delta\psi$ и восстановления цитохрома c_{ob} , что сопоставимо с тем, что наблюдалось при нейтральном значении pH , но в присутствии Zn^{2+} (ср. с рис. 3-6). В щелочных условиях, даже в отсутствие ионов цинка (кривая 1 на рис. 7Е), восстановление гема b_h в ответ на вспышку происходило наполовину, как при нейтральных значениях pH в присутствии Zn^{2+} .

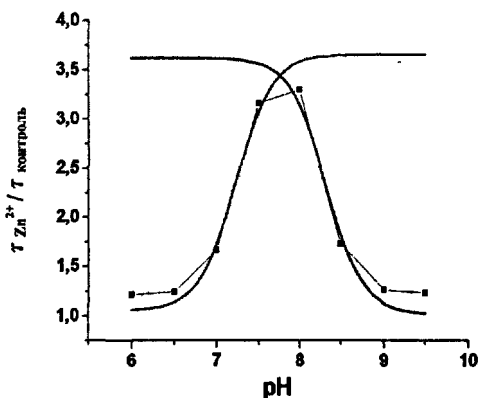


Рис.8. pH -зависимость выраженности ингибирующего эффекта ионов Zn^{2+} на время генерации $\Delta\psi$ цитохром bc_1 -комплексом. Экспериментальные точки аппроксимированы кривыми Хилла с $\text{pK } 7,2 \pm 0,2$ ($n=2$) и с $\text{pK } 8,3 \pm 0,3$ ($n=2$), соответственно.

Таким образом, хотя как при кислых, так и при щелочных значениях pH ингибирующее действие цинка пропадало, причины этого, видимо, были различны. В кислой области ингибирующее действие цинка пропадало, скорее всего, из-за того, что цинк-связывающие гистидиновые остатки протонировались и не могли связывать ионы Zn^{2+} . В щелочных же условиях ингибирующее действие цинка маскировалось общим торможением фермента, вызванным недостатком протонов и замедлением реакций в центре Q_1 .

2.5. Сравнение действия Zn^{2+} в условиях насыщающей и слабой индуцирующей вспышки.

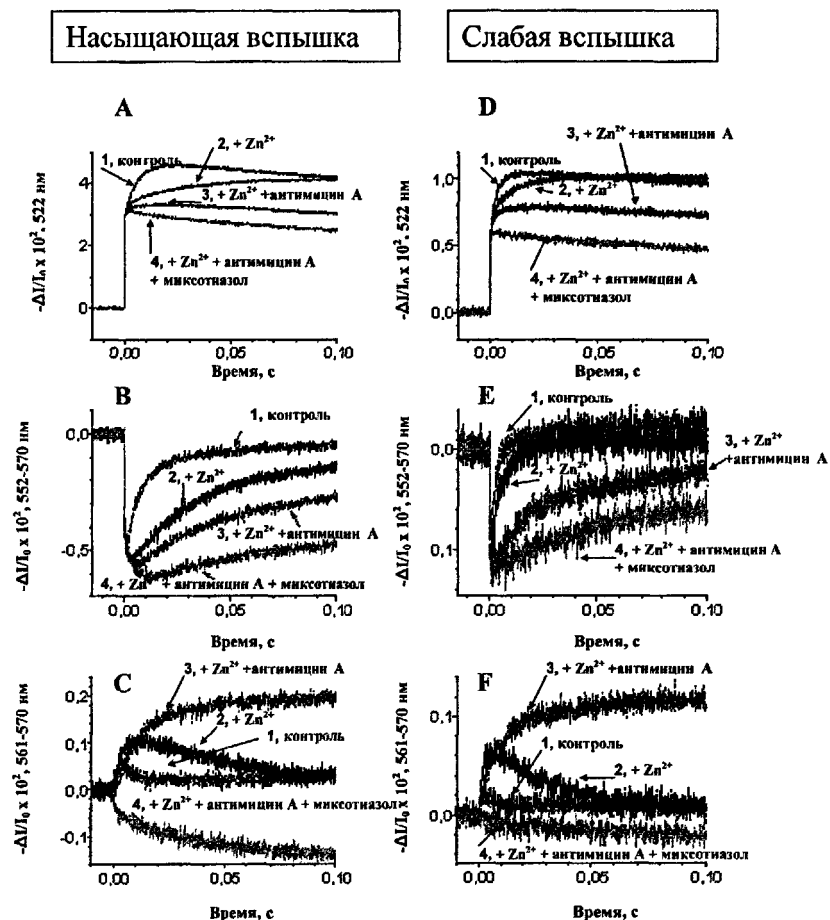


Рис. 9. Сравнение действия 75 мкМ Zn^{2+} в условиях насыщающей и слабой индуцирующей вспышки.

Насыщающая вспышка представлена на рис.(А, В, С), слабая индуцирующая вспышка - на рис. (D, E, F) Генерация $\Delta\psi$ цитохром bc_1 -комплексом представлена на рис. А, D, окислительно-восстановительные реакции цитохрома c_{66} показаны на рис. В, Е, редокс превращения гема b_h показаны на рис С, F

Поскольку соотношение РЦ и цитохром bc_1 -комплексов в наших препаратах было около 2,5 : 1, каждый цитохром bc_1 -комплекс срабатывал после вспышки несколько раз, что могло приводить к кажущемуся замедлению генерации $\Delta\psi$ и восстановления c_{66} относительно быстрого восстановления гема b_h при первом обороте фермента.

Чтобы проверить эту возможность, был поставлен опыт, в котором интенсивность возбуждающей вспышки была уменьшена примерно в 5 раз, таким образом, что возбуждалась только 1/5 РЦ, и, соответственно, только половина мономеров цитохром bc_1 -комплекса могла сработать по одному разу. На рис. 9 показан эффект от добавления 75 мкМ Zn^{2+} в условиях слабой вспышки. В условиях однократного срабатывания цитохром bc_1 -комплекса генерация $\Delta\psi$ (рис. 9D) имела характерное время $t_{1/2} \sim 7$ мс и, как и при насыщающей вспышке (рис. 9A), коррелировала с восстановлением c_{66} . Восстановление гема b_h по-прежнему характеризовалось полувременем $t_{1/2} \sim 1-2$ мс. Можно заключить, что различие между быстрой кинетикой восстановления гема b_h и медленными кинетиками генерации $\Delta\psi$ и восстановления c_{66} не пропадало и когда цитохром bc_1 -комплекс срабатывал только один раз.

2.7. Исследование действия ионов Zn^{2+} на цитохром bc_1 -комплекс в тяжелой воде

Генерация $\Delta\psi$, а также редокс реакции гема b_h и цитохрома c_{66} были исследованы в условиях, когда вода в пробе была заменена D_2O . Генерация $\Delta\psi$ происходила с $t_{1/2} = 4,4$ мс, несколько замедляясь по сравнению с водной средой ($t_{1/2} = 3$ мс). Восстановление гема b_h в отсутствии ингибиторов, как и в водной среде, происходило достаточно быстро и неразрешимо. В присутствии 50 мкМ $ZnSO_4$ гем b_h восстанавливался с $t_{1/2} = 2,5$ мс, т.е. несколько медленнее, чем H_2O (1-2 мс), и не же гема b_h замедлялось с $t_{1/2} = 22$ мс в водной среде до $t_{1/2} = 47$ мс в D_2O . Восстановление цитохрома c_{66} без цинка в D_2O происходило с $t_{1/2} = 5$ мс, а в присутствии Zn^{2+} с $t_{1/2} = 20$ мс. В присутствии 50 мкМ $ZnSO_4$ генерация $\Delta\psi$ происходила с $t_{1/2} = 17$ мс. Таким образом, замена H_2O на D_2O слабее влияла на восстановление гема b_h чем на генерацию $\Delta\psi$ и восстановление цитохрома c_{66} . Поэтому кинетическая разница между «быстрыми» и «медленными» реакциями в цитохром bc_1 -комплексе возрастала в тяжелой воде.

2.8. Индуцируемые вспышкой изменения pH внутри хроматофоров *Rb.capsulatus*.

Изменения pH внутри хроматофора в ответ на вспышку света регистрировались с помощью амфифильного pH-индикатора нейтрального красного в присутствии 5 мМ pH-буфера HEPES. Этой концентрации HEPES достаточно для подавления pH-ответов нейтрального красного в среде, омывающей хроматофору, но недостаточно для подавления pH-ответов во внутреннем очень малом объеме хроматофора (Mulikidjanian and Junge, 1994). Добавление к пробе 3мкМ K^+/H^+ обменника нигерицина снимало ΔpH .

Таким образом, разница ответов нейтрального красного $-/+$ нигерицина отражала изменения pH внутри хроматофоров, связанные с протонным обменом на p -стороне мембраны.

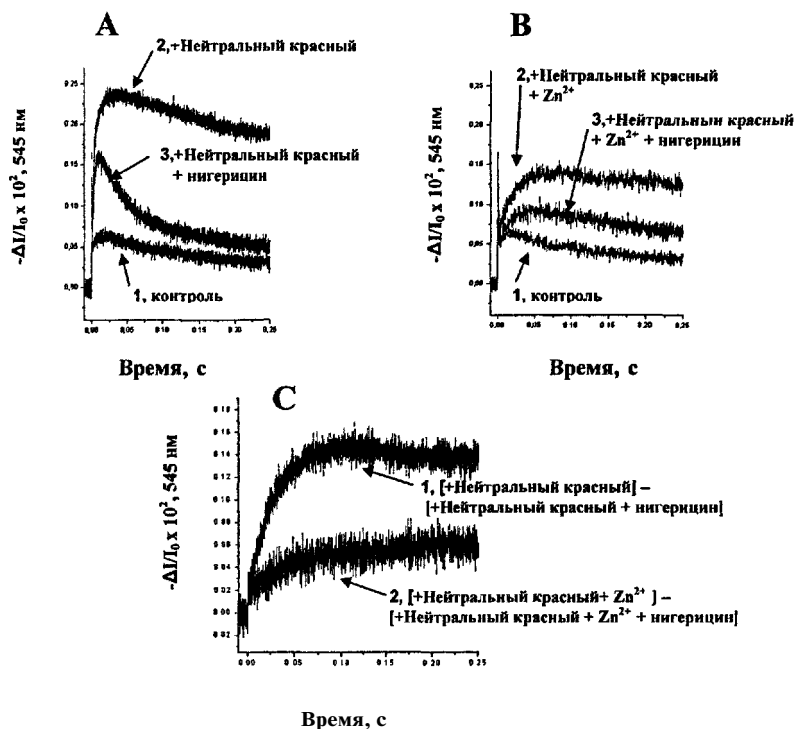


Рис. 10. Влияние 50 мкМ ZnSO_4 на выброс протонов внутрь хроматофора.

Индукированные вспышкой изменения поглощения при 545 нм в отсутствие ZnSO_4 (А) и в присутствии 50 мкМ ZnSO_4 (В) Разностные кинетики $-/+$ 3 мкМ нигерицина в отсутствие и в присутствии 50 мкМ ZnSO_4 (С) Концентрация K^+ в опыте = 50 мМ, pH снаружи хроматофора = 7,5.

На рис. 10А показаны изменения оптического поглощения нейтрального красного в ответ на вспышку, измеренные при 545 нм. На рис. 10В показаны изменения оптического поглощения нейтрального красною в ответ на вспышку в присутствии 50 мкМ ZnSO_4 Разностные кинетики $-/+$ нигерицин свидетельствуют о том, что цинк замедляет выброс протонов внутрь хроматофоров (рис. 10С).

Таким образом, в настоящей работе показано, что гем b_h восстанавливается в ответ на вспышку за 1-2 мс, т.е. значительно быстрее восстановления цитохромов c , генерации $\Delta\psi$ и выброса протонов внутрь хроматофоров. Это свидетельствует о том, что каталитический цикл цитохром bc_1 -комплекса включает в себя, по крайней мере, две стадии. На первом этапе, как показано на рисунке НА, молекула убихинола окисляется в центре Q_o , приводя к восстановлению и протонированию FeS-домена белка Риске и гема b_h соответственно. FeS-домен остается связанным с цитохромом b , как показано на рис. 11А. С гема b_l электрон переносится поперек мембраны на гем b_h ; неэлектрогенность этой реакции свидетельствует о ее электрической компенсации. На данной стадии высвобождения протонов в водную фазу не происходит.

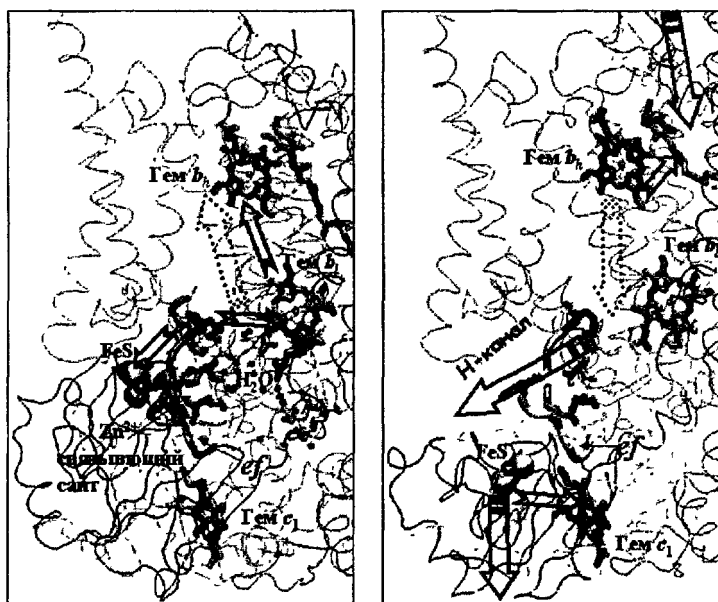
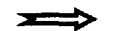


Рис.11 Схема каталитического цикла цитохром bc_1 -комплекса.

Перенос электрона



Перенос протона



Перераспределение зарядов при электростатической компенсации

внутримембранного переноса электрона



На следующей стадии, которая в присутствии 50 мкМ Zn^{2+} проходит примерно за 10 мс, происходят окисление гема b_h , восстановление цитохрома c_1 , выброс протона внутрь хроматофоров и генерация $\Delta\psi$. Кинетическое сопряжение этих реакций между собой, а также их параллельное замедление с увеличением концентрации цинка могут быть объяснены предположением, что Zn^{2+} -связывающий сайт, идентифицированный в структуре митохондриального цитохром bc_1 -комплекса (Bern et al., 2000), служит местом выхода протонов из центра Q_o . Данное предположение основано на структурном сходстве с Zn^{2+} -связывающим входным протонным каналом РЦ *Rb. sphaeroides* (Paddock et al., 2003) и на известной способности ионов цинка блокировать протонные каналы в разных ферментах (De Coursey, 2003). Как видно из рис. 11 А, Zn^{2+} связывающий сайт закрыт FeS-доменом белка Риске, когда последний состыкован с цитохромом b . Сайт, однако, становится доступным для воды после поворота FeS-домена к цитохрому c_1 . (см. рис. 11В). Известно, что поворачиваясь к цитохрому c_1 , FeS-домен «отодвигает» петлю ef цитохрома b (петля выделена толстым контуром и обозначена ef на рис. 11А.). Эта петля, в то же время, участвует в связывании иона Zn^{2+} , предоставляя один из гистидиновых лигандов (см. Рис. 11А). Таким образом, с увеличением концентрации цинка должны одновременно затрудняться и восстановление цитохрома c_1 подвижным FeS-доменом белка Риске и электрогенный выход протонов из центра Q_o , что и наблюдалось в экспериментах. Корреляция этих реакций с окислением гема b_h обусловлена, скорее всего, механическим (конформационным) сопряжением между центром Q_i и FeS-доменом белка Риске. Хотя механизм подобного сопряжения, впервые предложенного Мулкиджаняном и Юнге (1995), остается неясным, свидетельства в его пользу начинают накапливаться (Valkova-Valchanova et al. 2000, Berry & Huang, 2003, Cooley & Daldal, 2005).

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что ионы Zn^{2+} , добавленные в концентрации менее 100 мкМ, не нарушают целостности работы цитохром bc_1 -комплекса, а только замедляют его, делая возможным наблюдение редокс превращений высокопотенциального гема b_h цитохрома b в ответ на вспышку и их соотношение с электрогенными реакциями.
2. Выдвинуто предположение о том, что трансмембранный перенос электрона к гему b_h электростатически компенсируется перераспределением протонов и диэлектрической релаксацией белка, поскольку не сопровождается заметной генерацией $\Delta\psi$.
3. Обнаружено, что генерация $\Delta\psi$ и ΔpH цитохром bc_1 -комплексом сопряжены с восстановлением цитохрома c_1 убихинолом и коррелируют с окислением гема b_h .
4. Сделан вывод, что каталитический цикл цитохром bc_1 -комплекса включает в себя, по крайней мере, две стадии. На первом этапе молекула убихинола окисляется в центре Q_o , приводя, соответственно, к восстановлению и протонированию FeS-домена белка Риске и низкопотенциального гема b_l , с которого электрон переносится на гем b_h . На следующей стадии происходят окисление гема b_h , восстановление цитохрома c_1 , выброс протонов внутрь хроматофоров и генерация $\Delta\psi$.
5. На основе имеющихся структурных данных предложена механическая модель сопряжения электрогенного выброса протонов цитохром bc_1 -комплексом (генерации $\Delta\psi$) с восстановлением цитохрома c_1 подвижным FeS-доменом белка Риске.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

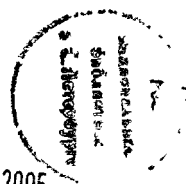
Статьи

1. Klishin, S.S., D.A. Cherepanov, and A.Y. Mulikidjanian. 2001. Resolution of proton and electron transfer events in the photosynthetic reaction center and the cytochrome-*bc_L* complex of phototrophic bacteria. In PS2001. 12th International Congress of Photosynthesis. Brisbane. S12-005 (electronic publication).
2. Klishin, S.S., W. Junge, and A.Y. Mulikidjanian. 2002. Flash-induced turnover of the cytochrome *bc_L* complex in chromatophores of *Rhodobacter capsulatus*: binding of Zn^{2+} decelerates likewise the oxidation of cytochrome *b*, the reduction of cytochrome *C* and the voltage generation. *Biochim. Biophys. Acta* 1553:177-182.
3. Klishin, S.S. and A.Y. Mulikidjanian. 2005. Proton transfer paths at the quinone oxidizing site of the *Rb. capsulatus* cytochrome *bc* complex. In *Photosynthesis: Fundamental aspects to global perspectives*. (A. van der Est and D. Bruce, editors). Montreal, в печати.

Тезисы конференций

4. Klishin, S.S., W. Junge, and A.Y. Mulikidjanian. 2002. Flash-induced turnover of the cytochrome *bc_L*-complex in chromatophores of *Rhodobacter capsulatus*: The *bc_L*-dimer is not able to accumulate more than one electron on its two high-potential hemes. In *EBEC Short Reports*, Vol.12. Elsevier, Arcachon. p. 222.
5. Cherepanov, D.A., S.S. Klishin, and A.Y. Mulikidjanian. 2003. Relaxation control over biological electron transfer: Some illustrative examples. In *Proceedings of the 6th International Symposium of the Volkswagen-Stiftung on Intra- and Intermolecular Electron Transfer*. Köln, Germany, p. 50.
6. Klishin, S.S., W. Junge, and A.Y. Mulikidjanian. 2003. Cytochrome-*bc_L* complex of *Rhodobacter capsulatus*: Separation of the catalytic cycle into partial steps. In *Proceedings of 11th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes*. Tokio. p. 130.
7. Klishin, S.S. and A.Y. Mulikidjanian. 2004. Breaking down the flash-induced turnover of the cytochrome *bc* complex into partial steps. In *Proceedings of the 13th European Bioenergetic Conference*. Pisa, Italy, p. 169.
8. Klishin, S.S. and A.Y. Mulikidjanian. 2004. Proton transfer paths at the quinone oxidizing site of the *Rb. capsulatus* cytochrome *bc* complex. In *Proceedings of the 13th International Congress on Photosynthesis*. Montreal, p. 148.
9. Mulikidjanian, A.Y., D.A. Cherepanov, B.A. Feniouk, O.A. Gupta, S.S. Klishin, M.A. Kozlova, D.A. Khorre, Baciou, L., P. Sebban, and W. Junge. 2004. Proton transfer dynamics in photosynthetic membranes. In *Proceedings of the 13th European Bioenergetic Conference (Plenary Lecture)*. Pisa, Italy, p. 37.
10. Klishin, S.S. and A.Y. Mulikidjanian. 2005. Electron/proton coupling in the cytochrome *bc_L* complex of *Rhodobacter capsulatus*. 2005 Biophysical Society Annual Meeting, Long Beach, USA, *Biophys. J.* 88, 326a.
11. Klishin S.S., A.Y. Mulikidjanian A.Y., 2005, Proton transfer at the quinone oxidizing site of the cytochrome *bc_L* complex of *Rhodobacter capsulatus*, тезисы международной конференции «Российская биоэнергетика: От молекул к клетке» Москва.

Отпечатано в типографии «Альянс 2002»
117630, Москва, ул. Академика Челомея, 8-3
Тираж 100 экз. Заказ 018.



07 МАЙ 2005

2014