

УДК 577.32,577.352.3

## ОБ УЧАСТИИ ПРОТОНОВ В РАБОТЕ ФАКТОРА $F_1$ АТФ-СИНТАЗЫ ПРИ СИНТЕЗЕ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТА

© 2023 г. С. В. Нестеров<sup>1,\*</sup>, Л. С. Ягужинский<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия

\*E-mail: semen.v.nesterov@phystech.edu

Поступила в редакцию 05.10.2022 г.

После доработки 05.10.2022 г.

Принята к публикации 11.10.2022 г.

Показано, что в работе  $F_1$ -субъединицы АТФ-синтазы, на которой осуществляется реакция синтеза аденозинтрифосфата (АТФ), принимают участие ионы водорода, попадающие на  $F_1$  после трансмембранного переноса через  $F_0$ -субъединицу. Протонирование аминокислотных остатков глутамата и аспартата существенно меняет конформацию фермента, что наряду с описанным в литературе механическим движением  $\gamma$ -субъединицы является важным фактором, обеспечивающим конформационные переходы в АТФ-синтазе. Связывание с  $F_1$ -фактором АТФ-синтазы протонов во время работы фермента также необходимо для обеспечения самой реакции синтеза АТФ, которая благодаря использованию трансмембранно перенесенных через  $F_0$  протонов не замедляется в неравновесных условиях защелачивания примембранной зоны во время работы протонных помп. Вращение АТФ-синтазы при этом может катализировать обмен протонами между фазами примембранной и объемной воды. Сделано заключение, что конформационная модель работы АТФ-синтазы должна быть дополнена и в ней должно быть учтено протонирование  $F_1$ -фактора.

DOI: 10.56304/S1992722323010077

### ОГЛАВЛЕНИЕ

#### Введение

1. Общность принципов устройства и функционирования АТФ-синтаз F-типа различных организмов

2. Экспериментальное обоснование конформационной модели Бойера функционирования АТФ-синтаз F-типа

3. Обоснование наличия кинетического барьера для обмена протонами между объемной фазой и примембранной зоной искусственных и биологических мембран

4. Депротонирование АТФ-синтазы митохондрий при включении протонных помп

5. Энергозависимое протонирование фактора  $F_1$  АТФ-синтазы с участием  $F_0$ -субъединицы

6. Участие протона в каталитическом акте синтеза АТФ в  $F_1$ -факторе

#### Заключение

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее рациональных методов для формирования подходов к достижению углерод-нейтрального энергодобавления является использование в качестве основы природных заведомо сбалансированных процессов, причем необходимо проведение анализа не только на глобальном уровне экосистем и биосферы, но и на самом базовом уровне – от отдельных организмов до молекулярных метаболических процессов в них. Ключевую роль во взаимодействии живых систем играют биоэнергетические процессы фотосинтеза и окислительного фосфорилирования (ОКСФС).

На основании глубокого анализа имеющихся биохимических данных по энергетике митохондрий, Р. Вильямс в 1961 г. обосновал роль полупроницаемых мембран в качестве ключевого структурного элемента в системе энергетики клетки, а также отметил роль ионов водорода в качестве основного носителя энергии в биоэнергетических мембранных системах [1]. Параллельно П. Митчелл предложил широко известную конкретную модель работы фосфорилирующей

системы митохондрий, основанную на трансмембранном переносе ионов водорода [2]. Эта модель позволила определить промежуточную стадию запасаения энергии биологических реакций в форме электрохимического потенциала ионов водорода. Прямое участие ионов водорода в функционировании АТФ-синтазы было показано в Институте электрохимии РАН и Институте физико-химической биологии МГУ [3]. Настоящая работа посвящена анализу ряда работ, посвященных прямому участию ионов водорода в функционировании фактора  $F_1$  АТФ-синтазы хлоропластов и митохондрий. Эти данные, в том числе полученные соавторами настоящей статьи, подвергнуты повторному теоретическому анализу в связи с очевидной необходимостью согласовать их с конформационной моделью работы АТФ-синтазы, предложенной П. Бойером (нобелевская премия по химии 1997 г.).

## 1. ОБЩНОСТЬ ПРИНЦИПОВ УСТРОЙСТВА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АТФ-СИНТАЗ F-ТИПА РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Рассмотрим АТФ-синтазы из различных живых организмов. Отметим, что все АТФ-синтазы F-типа, в том числе синтазы митохондрий и хлоропластов, крайне схожи как по общему строению (организации и наличия основных субъединиц), так и в атомарных аспектах функционирования – каталитический центр  $\beta$ -субъединицы и ключевые аминокислоты протонных каналов  $F_0$  очень консервативны [4, 5]. Структура АТФ-синтазы ( $F_0F_1$ ) растений и многоклеточных организмов включает в себя два качественно различных фрагмента – мембранный  $F_0$ , осуществляющий трансмембранный перенос протонов, а также гидрофильный фактор  $F_1$ , в котором осуществляется синтез АТФ. У всех АТФ-синтаз имеются вращающееся  $c$ -кольцо в мембране, передающая крутящий момент от  $F_0$  на  $F_1$  центральная ножка, гетеротример из каталитических  $\beta$ - и регуляторных  $\alpha$ -субъединиц, мембранная статорная субъединица с двумя протонпроводящими полуканалами, а также периферическая ножка, дополнительно связывающая  $F_0$  и  $F_1$  (рис. 1). Основное различие между АТФ-синтазами F-типа разных организмов заключается в разном количестве  $c$ -субъединиц в мембранной части ротора, что принципиально не меняет механизма функционирования.

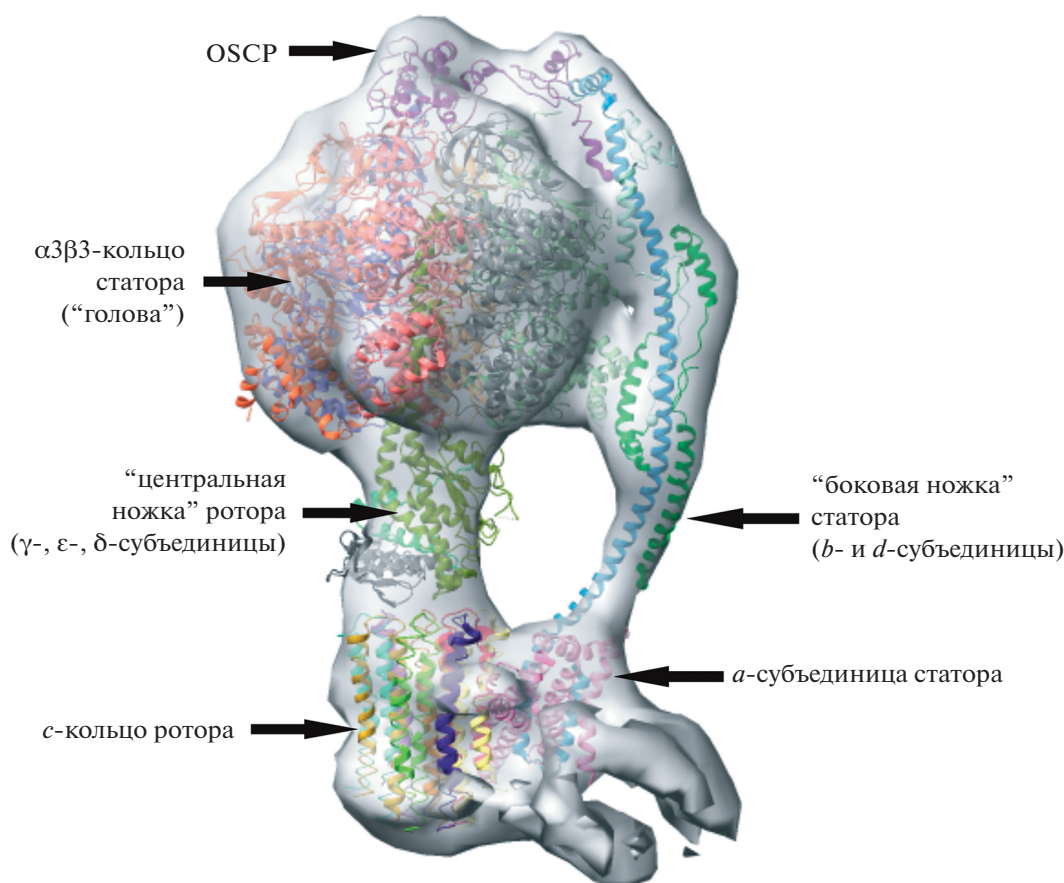
Важным свойством АТФ-синтазы хлоропластов является способность к активации на свету и инактивации в темноте. Высокоточные структурные данные позволяют заключить, что в основе этой регуляции находятся два цистеина  $\gamma$ -субъединицы, образование и разрыв дисульфидной связи между которыми регулируются светозави-

симой (потенциал-зависимой) работой тиоредоксиновой системы [7, 8]. У митохондрий и бактерий также есть система ингибирования активности гидролитической активности АТФ-синтазы при снижении потенциала [9]. Вместо характерной для хлоропластов редкос-регуляции активности в митохондриях реализуется потенциал-зависимое ингибирование гидролиза АТФ присоединением специальной регуляторной субъединицы  $IF_1$  [10], которая при снижении мембранного потенциала блокирует вращение ротора в сторону, соответствующую гидролизу АТФ. Это говорит о том, что, несмотря на некоторые регуляторные различия, качественно регуляция гидролитической активности различных АТФ-синтаз не различается – снижение потенциала ведет к блокированию гидролиза.

Таким образом, функционирование всех АТФ-синтаз F-типа в основном идентично, а различия проявляются лишь в некоторых деталях и регуляторных аспектах, связанных с адаптацией к конкретным условиям среды и особенностям метаболизма живых организмов, в которых эти АТФ-синтазы функционируют. Это позволяет вести мета-анализ и синтез имеющихся данных о работе АТФ-синтаз F-типа в различных организмах.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ МОДЕЛИ БОЙЕРА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АТФ-СИНТАЗ F-ТИПА

За последние три десятилетия произошел большой прогресс в изучении механизма работы АТФ-синтаз. Одним из важнейших открытий в этой области является предложенный и обоснованный П. Бойером механизм катализа синтеза АТФ, согласно которому образование АТФ в каталитическом центре фермента происходит практически изоэнергетически, а вся внешняя энергия расходуется на стадии отсоединения АТФ от каталитического центра [11]. Структурные исследования, проведенные при активном участии Дж. Уокера [12], подтвердили концепцию механохимического сопряжения, согласно которой энергия на каталитический центр передается механически при вращении центральной ножки фермента ( $\gamma$ -субъединицы), что индуцирует конформационные изменения в активном центре. Вращение АТФ-синтазы в процессе гидролиза АТФ удалось визуализировать [13, 14], а также индуцировать *in vitro* синтез АТФ за счет механического вращения в магнитном поле ротора АТФ-синтазы с пришитой магнитной частицей [15]. Эта же методика позволила дополнительно подтвердить, что вращение  $\gamma$ -субъединицы приводит к изменению сродства нуклеотидов к ферменту [16].



**Рис. 1.** Структура АТФ-синтазы митохондрий [6]. Альфа-спиральное отображение взято со структуры АТФ-синтазы быка (PDB: 5AR). Электронная плотность фермента с разрешением 13 Å получена с помощью криоэлектронной томографии в НИЦ “Курчатовский институт” в нативных условиях без выделения из митохондриальной мембраны.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в исследовании АТФ-синтаз, полная теория функционирования этой уникальной природной машины на атомарном уровне не доработана. Приблизительно один и тот же механизм, предложенный П. Бойером, приводится с дополнением его промежуточными конформациями в большинстве последних научных работ по теме [17–22]. Кратко, при достижении необходимой упругой энергии после нескольких поворотов *c*-кольца происходят поворот  $\gamma$ -субъединицы на  $120^\circ$  и изменение конформации  $\beta$ -субъединиц таким образом, что происходит изменение сродства к нуклеотидам и из одной  $\beta$ -субъединицы АТФ высвобождается.

В рамках данной публикации сконцентрируемся на двух факторах, которые не учитываются в большинстве работ. Во-первых, на наличии высокого барьера для отрыва протонов от поверхности белков и липидов мембраны [23], а во-вторых, на том, что  $F_1$ -фактор АТФ-синтазы способен связывать на себе большое количество протонов. Далее оба эти положения подкрепим экспериментальными свидетельствами, а также рассмот-

рим их влияние на функционирование АТФ-синтазы.

### 3. ОБОСНОВАНИЕ НАЛИЧИЯ КИНЕТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ДЛЯ ОБМЕНА ПРОТОНАМИ МЕЖДУ ОБЪЕМНОЙ ФАЗОЙ И ПРИМЕМБРАННОЙ ЗОНОЙ ИСКУССТВЕННЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

До сих пор остается открытым вопрос о функциональной значимости кинетического барьера в примембранной зоне, блокирующего реакцию быстрого отрыва ионов водорода от поверхности искусственных мембран [24], мембран митохондрий [25] и митопластов [26]. По-видимому, основной причиной наличия такого барьера является сниженная диэлектрическая постоянная фракции воды в приграничной зоне гидрофобной границы мембрана–вода. Если в объеме воды  $\epsilon \approx 80$ , то в приграничных слоях с поверхностями  $\epsilon \leq 10$  [27]. Известно, что механическое перемещение межфазной границы может устранять барьер для обмена протонами между объемом и

примембранной зоной [28]. В [23] эффект замедленного отрыва ионов водорода от поверхности мембран подробно описан и подкреплен массивом экспериментальных данных. Было показано, что слабые основания (такие как  $\text{HEPES}$ ,  $\text{MES}$ ) катализируют реакцию отрыва неравновесно связанных протонов от поверхности мембран. Этот каталитический механизм часто путают с буферными свойствами тех же слабых оснований, которые проявляются и используются при работе с равновесными системами.

Кинетический барьер в реакции переноса протона из объема водной фазы на внутренней поверхности мембраны был также обнаружен при работе протонной помпы на субмитохондриальных частицах (СМЧ), обладающих инвертированной ориентацией внутренней мембраны [29]. Эффект кинетического барьера на митохондриях и СМЧ наблюдается и в присутствии стандартных концентраций протонофоров ( $\text{FCCP}$ , пентахлорфенола) (подробнее об особенностях работы разобщителей с учетом наличия примембранной фазы воды в обзоре [30]). Добавление слабых оснований Льюиса снижает этот кинетический барьер, а добавление ингибитора протонных помп переводит систему в равновесное состояние и блокирует защелачивание поверхности СМЧ. Таким образом, условия по обе стороны мембраны схожи, и с обеих сторон мембраны существует достаточно высокий барьер для обмена протонами между примембранной зоной и водной фазой.

Эффект образования межфазных границ между различными водными растворами биополимеров активно исследуется в последнее десятилетие. Это явление носит название фазового разделения жидких фаз (фазовой сепарации жидкость–жидкость) и согласно новым данным находится наряду с мембранами в основе клеточной самоорганизации (обзоры [31, 32]). Фазовое разделение жидких фаз внутри клетки предполагалось еще в конце XIX – начале XX века [33, 34], однако такой взгляд на клеточную организацию был вытеснен мембранной теорией клетки. Новый импульс развития это направление исследований получило только в XXI веке, когда было показано существование жидких безмембранных конденсатов в клетке, отделенных от остальной цитоплазмы [35]. Наибольший эффект стимуляции фазовой сепарации имеют неупорядоченные активно взаимодействующие с водой части биополимеров [36]. Важно указать, что поверхность  $F_1$ -фактора АТФ-синтаз покрыта гидрофильными аминокислотами, а сами  $\beta$ - и  $\alpha$ -субъединицы имеют области низкой упорядоченности [5], неупорядоченность которых может еще больше возрастать в процессе конформационных перестроек. Это говорит о том, что АТФ-синтаза может влиять на фазовое разделение.

Фазовая сепарация с образованием жидкого конденсата может стимулироваться и образованием кластеров (“рафтов”) в мембране [37] ввиду поляризации воды и ее взаимодействия с липидными и белковыми компонентами мембраны. Интересно, что кластеризация системы ОКСФОС недавно была показана экспериментально в митохондриях сердца [38]. Далее при рассмотрении процессов переноса протона будем учитывать описанный выше феномен и рассматривать примембранные зоны по обе стороны мембраны как отдельные фазы, отрыв протонов из которых или приход в них из объема будет затруднен в отсутствие слабых оснований, катализирующих обмен протонами через межфазную границу.

#### 4. ДЕПРОТОНИРОВАНИЕ АТФ-СИНТАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ ПРОТОННЫХ ПОМП

Рассмотрим подробно эксперименты по изменению локального рН с помощью ковалентной пришивки рН-чувствительного флуоресцентного зонда – флуоресцеинизотиоционата (ФИТЦ) [25, 29, 39]. В рамках этих работ показано, что основная часть зонда ФИТЦ связывается с поверхностью внутренней мембраны митохондрий, а именно с  $\gamma$ - и  $\alpha$ -субъединицами фактора  $F_1$  АТФ-синтазы [39]. При этом и на препаратах митохондрий, и на препаратах СМЧ с инвертированной топологией внутренней мембраны удалось наблюдать изменения флуоресценции ФИТЦ при включении и выключении протонных помп. По измерению спектров флуоресценции ФИТЦ было показано, что включение протонных помп приводит к диссоциации протонов от зонда. Учитывая, что местом пришивки значительной части зонда является  $F_1$ -фактор, выводы можно дополнительно уточнить – в условиях работы протонных помп происходит диссоциация протонов с ионогенных групп фактора  $F_1$ . Это говорит о переносе протонов между протонными помпами и АТФ-синтазой вдоль мембраны по межфазной границе (примембранной зоне на рис. 2), а также о том, что прямой обмен протонами между объемной фазой и примембранной зоной затруднен. Схема процесса переноса протона в экспериментах на СМЧ приведена на рис. 2.

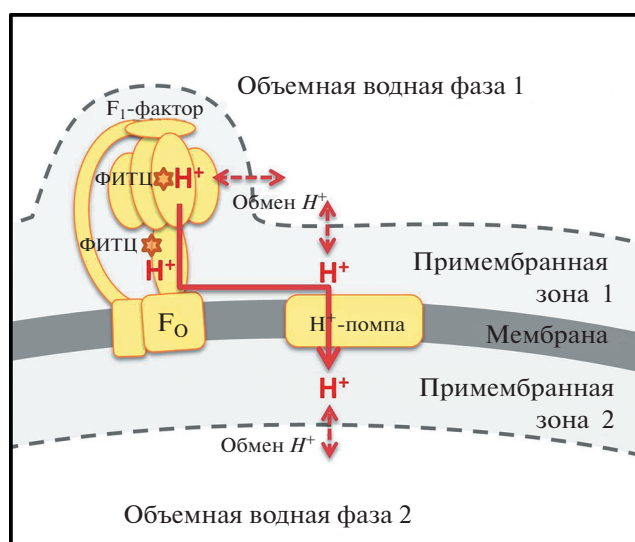
#### 5. ЭНЕРГОЗАВИСИМОЕ ПРОТОНИРОВАНИЕ ФАКТОРА $F_1$ АТФ-СИНТАЗЫ С УЧАСТИЕМ $F_0$ -СУБЪЕДИНИЦЫ

В [40] методом титрования буферной емкости хлоропластов показано, что буферная емкость органелл в диапазоне рН 7–9 резко возрастает при освещении. Позднее этот эффект был подробно изучен в работах Е.К. Золотаревой и соав-

торов. В [41, 42] эффект был подтвержден (рис. 3в), а также обнаружено, что гиперпротонирование  $F_1$  блокируется дициклогексилкарбодиемидом (DCCD), ингибирующим работу  $c$ -ротора  $F_0$ -фрагмента АТФ-синтазы. Специальные опыты в среде, содержащей тритиевую воду, показали, что в условиях наличия потенциала на мембране тилакоидов (на свету) тритиевая метка обнаруживалась и в выделенном  $F_1$ -факторе АТФ-синтазы, причем с одной молекулой  $F_1$  может связаться более 100 ионов трития (рис. 3г). Таким образом, при высокой концентрации трития в среде он активно связывается с  $F_1$ -фактором АТФ-синтазы, однако это происходит только при наличии трансмембранного переноса ионов водорода через  $F_0$ -субъединицу. Это позволяет предположить механизм, согласно которому на свету в условиях работы протонной помпы (цитохром- $b_6f$ -комплекс) тритий сначала из среды попадает в люмен тилакоида (а точнее, в примембранный слой со стороны люмена), а далее уже под действием электрохимического градиента проходит через  $F_0$ , попадая на  $F_1$  и связываясь с ионогенными группами на его поверхности (рис. 3а).

Более детальные опыты по исследованию стабильности связи трития с  $F_1$  показали, что при многочасовой инкубации хлоропластов в среде с тритием в них формируется фракция мембраносвязанных ионов трития, которая сохраняется даже после многократных отмывок хлоропластов от трития [43]. Исследования на свету и в темноте при наличии мембраносвязанной фракции трития в хлоропластах показали, что в этих условиях перемещение трития с внутренней поверхности мембраны тилакоидов через  $F_0$  на фактор  $F_1$  наблюдается только при фосфорилировании, т.е. при очень активном трансмембранном переносе через  $F_0$  [44] (рис. 3б, 3д). Этот эффект блокируется как ингибитором протонного канала в  $F_0$  — DCCD, так и высокими дозами разобщителя (грамицидина А), блокирующими фосфорилирование [44].

На следующем этапе исследований обнаружили, что при светозависимом переносе протонов между  $F_0$  и  $F_1$  происходит структурная перестройка АТФ-синтазы, проявляющаяся в резком ослаблении связи между гидрофильной  $F_1$ -субъединицей и мембранной субъединицей  $F_0$  [45]. Важно указать, что эта перестройка также блокируется DCCD. Такое протон-зависимое снижение связи между субъединицами объясняется протонированием части аминокислотных остатков  $\gamma$ -субъединицы, которые при этом перестают участвовать в образовании мультивалентной связи между  $F_0$  и  $F_1$ , образуемой противоположно заряженными аминокислотами. Ионогенными



**Рис. 2.** Схематичное изображение устройства примембранных зон около внутренней мембраны митохондрий. Показана схема экспериментов с СМЧ и митохондриями, в которых наблюдается депротонирование  $F_1$ -фактора АТФ-синтазы при включении протонных помп.

группами, протонирование которых меняется в  $F_1$  и влияет на конформацию фермента, являются карбоксильные группы глутамата и аспартата [46].

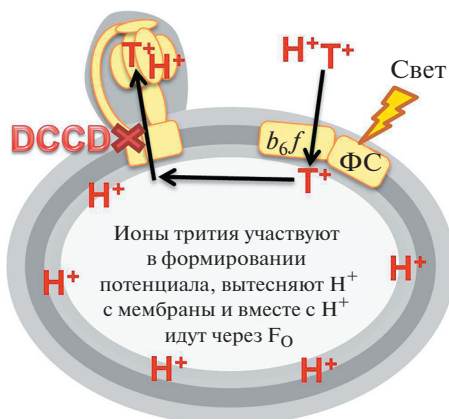
Таким образом, детальный анализ результатов упомянутых выше работ по исследованию протонирования  $F_1$ -субъединицы АТФ-синтазы в хлоропластах в разных условиях убедительно показывает, что имеющиеся на ней в большом количестве (несколько сотен на молекулу) поверхностные карбоксильные группы связывают ионы водорода (или трития), трансмембранно перенесенные из люмена через  $F_0$ -субъединицу во время функционирования фермента.

## 6. УЧАСТИЕ ПРОТОНА В КАТАЛИТИЧЕСКОМ АКТЕ СИНТЕЗА АТФ В $F_1$ -ФАКТОРЕ

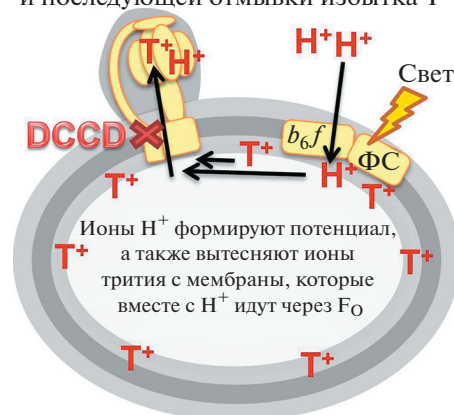
Как известно, протон вместе с фосфатом и аденозиндифосфатом (АДФ) является одним из субстратов в реакции синтеза АТФ, а при синтезе АТФ на выделенных митохондриях наблюдается защелачивание среды. Протоны, как правило, с помощью методов структурного анализа не идентифицируются, или получаемого разрешения недостаточно для их однозначной идентификации. В связи с этим детальное рассмотрение движения протона в каталитических центрах АТФ-синтазы обычно не проводится, лишь указывается, что донорами протона могут выступать имеющиеся там аминокислоты. При этом каталитические



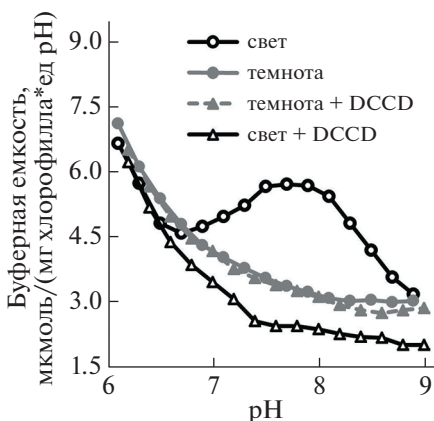
(а) Высокая концентрация трития в среде, без предварительной инкубации хлоропласт в тритиевой среде



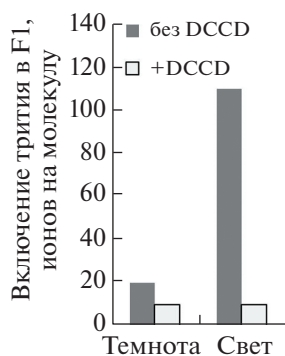
(б) Тритий накоплен в мембране хлоропласт путем инкубации в среде с высокой концентрацией трития и последующей отмывки избытка T<sup>+</sup>



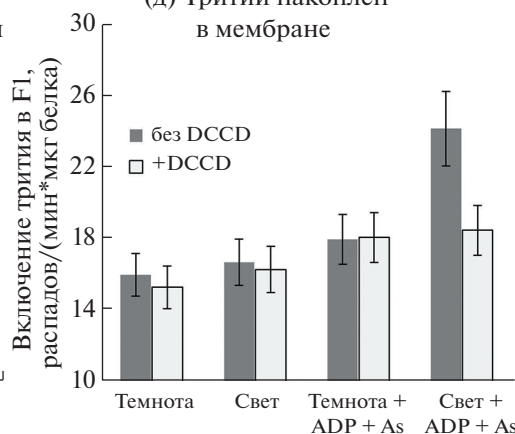
(в) Титровка хлоропласт кислотой



(г) Высокая концентрация трития



(д) Тритий накоплен в мембране

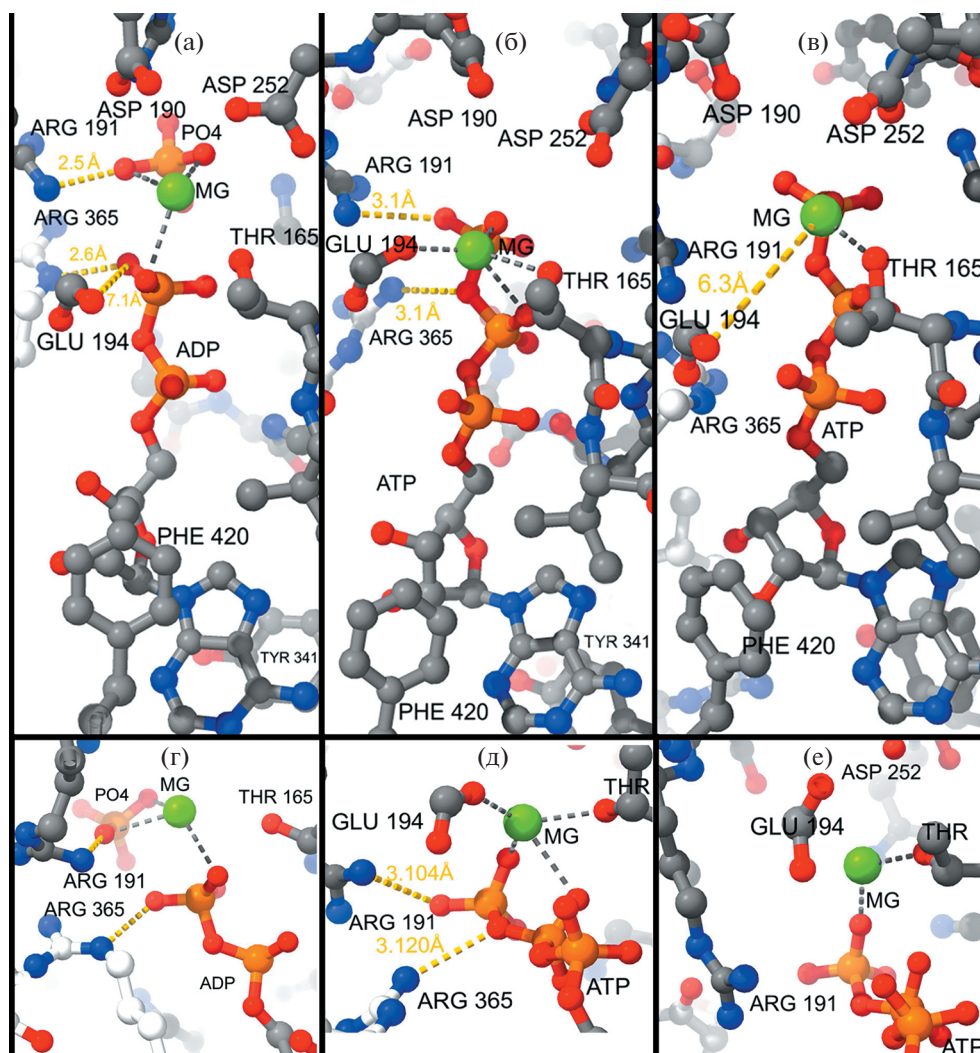


**Рис. 3.** Накопление трития на F<sub>1</sub>-факторе АТФ-синтазы в различных экспериментальных условиях. При высокой концентрации трития в среде наблюдается светозависимое протонирование F<sub>1</sub>, которое блокируется при ингибировании протонного переноса через F<sub>0</sub> (+DCCD) (а). В условиях отмывки хлоропластов от трития и наличия только фракции мембраносвязанного трития статистически значимое увеличение связывания трития с F<sub>1</sub> удается наблюдать только в условиях фосфорилирования, т.е. при высокой скорости транспорта ионов водорода через F<sub>0</sub> (б).

центры АТФ-синтазы выступают из мембраны в сторону слабощелочной среды матрикса митохондрий, находясь, как показано в предыдущем разделе, в примембранной зоне, где наблюдается устойчивое защелачивание при работе протонных помп. В связи с этим не праздным является вопрос, как осуществляется репротонирование донорных аминокислот, отдающих протон в ходе реакции синтеза АТФ.

На рис. 4 приведены детальные структуры каталитических центров трех разных β-субъединиц в одном и том же F<sub>1</sub>-факторе, конформация которых соответствует трем разным состояниям цикла синтеза/гидролиза АТФ по Бойеру. Можно видеть, что адениновый нуклеотид скоординирован π-связями с ароматическими аминокислотами фенилаланином и треонином. В ходе Бойеров-

ского цикла конформация этой части активного центра немного меняется, что может влиять на сродство нуклеотида к ферменту, однако более интересные и существенные изменения происходят в самом реакционном центре, в области иона магния, катализирующего реакцию. В момент перед синтезом (или после гидролиза) субстраты достаточно крепко связаны с активным центром: неорганический фосфат и β-фосфат АДФ удерживаются положительно заряженными аргининами. Отметим, что в активный центр ион магния попадает вместе с молекулой АДФ, но не с фосфатом. В положении на рис. 4а, 4г магний уже переместился в каталитическое положение, в котором связан с обоими основными субстратами реакции. На другом этапе (рис. 4б, 4д) уже произошло формирование фосфатной связи, однако молекула АТФ наиболее крепко связана с



**Рис. 4.** Структура каталитического центра на трех различных  $\beta$ -субъединицах АТФ-синтазы аэробной бактерии *Bacillus subtilis* (структура из банка данных PDB: 7L1Q, рисунок подготовлен с помощью программы ChimeraX). В первом каталитическом центре со связанными молекулами АДФ и фосфата ион магния взаимодействует с неорганическим фосфатом и  $\beta$ -фосфатом АДФ (а, г). Во втором центре со связанной молекулой АТФ ион магния взаимодействует с  $\gamma$ -и  $\beta$ -фосфатами АТФ (расстояния 2.2 и 2.8 Å соответственно), а также с глутаматом 194 (б, д). В третьем центре со связанной молекулой АТФ ион магния слабее связан с фосфатами АТФ (расстояние 2.4 Å до  $\gamma$  и 3.3 Å до  $\beta$ -фосфата) и непосредственно не связан с глутаматом 194 (в, е).

ферментом. Можно видеть, что в этом положении все четыре валентности иона магния заняты, причем он взаимодействует не только с АТФ, но и с двумя аминокислотами фермента (глутамат 194 и координационная связь с треонином 165). Вместе с тем кислороды фосфатных групп АТФ взаимодействуют с двумя положительно заряженными аргининами. Таким образом, фосфатный участок молекулы АТФ посредством иона магния очень крепко связан с ферментом. Ситуация меняется при следующей конформации фермента (рис. 4в). Аргинины 191 и 365 ( $\alpha$ -субъединицы) удаляются от молекулы АТФ на расстояния более 4 и 5 Å соответственно. Отчетливо видно, что связь магния с глутаматом 194 распадается (рас-

стояние более 6 Å), сохраняются только связь с  $\gamma$ -фосфатом и слабая координационная связь с треонином. Свободные валентности магния, вероятно, могут быть заполнены связями с водой, присутствующей в полости между ним и аспартатами 190 и 252 (наличие воды в этой полости, например, показано в одной из доступных структур АТФ-синтазы хлоропластов, PDB: 6FKF). Такая конформация активного центра соответствует гораздо более слабой связи АТФ с ферментом. При небольшом изменении конформации он может оторваться от каталитического центра. Отметим, что согласно последним структурным данным, уточняющим изначально предложенную Бойером модель, у каждого из основных трех состоя-

ний синтазы (состояния поворота  $\gamma$ -субъединицы на 120°) существуют дополнительные подсостояния. До шести состояний фермента наблюдалось на выделенном F<sub>1</sub>-факторе [20] и семь обнаружено на F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> АТФ-синтазе [47].

Приведенные структуры показывают, что донорами протона являются консервативные карбоксильные группы, присутствующие в активном центре всех АТФ-синтаз. В то время как глутамат 194 участвует в реакции, аспартаты 190 и 252 могут служить для транспорта в активный центр протона, который может передвигаться по цепочкам молекул воды и карбоксильных групп подобно тому, как это происходит в *d*-канале цитохром *c*-оксидазы – ключевой протонной помпы в митохондриях [48], имеющем в своем составе консервативные глутаматы/аспартаты [49]. Именно протонирование карбоксильных групп гидрофильной части F<sub>1</sub>-фактора наблюдалось в экспериментах на хлоропластах при работе АТФ-синтазы. Приведенный структурный анализ позволяет заключить, что протонирование F<sub>1</sub>-фактора является не просто случайным феноменом, а необходимо для бесперебойной подачи протонов в активный центр и тем самым обеспечения высокой скорости синтеза АТФ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ цикла экспериментальных работ, который позволил сделать заключение, что конформационная модель работы АТФ-синтазы должна быть дополнена приведенной выше информацией. Помимо непосредственного изменения конформации активных центров за счет механического вращения ротора важным фактором при работе этой молекулярной машины является передача протонов от F<sub>0</sub>-субъединицы на каталитический центр фактора F<sub>1</sub>, что обеспечивает эффективное протекание реакции синтеза АТФ в неравновесных условиях защелачивания примембранной зоны во время работы протонных помп. Рассмотрение этих данных с учетом наличия барьера переноса протона между фазами позволяет также предположить, что вращение АТФ-синтазы с перемешиванием межфазной границы способствует ускорению обмена ионами водорода между примембранной зоной и объемной водной фазой.

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” в рамках тематического плана “Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Williams R.J.P.* // *J. Theor. Biol.* 1961. V. 1. P. 1. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(61\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0022-5193(61)90023-6)

2. *Mitchell P.* // *Nature.* 1961. V. 191. P. 144. <https://doi.org/10.1038/191144a0>

3. *Yaguzhinsky L.S., Boguslavsky L.I., Volkov A.G., Rakhmaninova A.B.* // *Nature.* 1976. V. 259. P. 494. <https://doi.org/10.1038/259494a0>

4. *Junge W., Nelson N.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2015. V. 84. P. 631. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034124>

5. *Vlasov A.V., Osipov S.D., Bondarev N.A. et al.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2022. V. 79. P. 179. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04153-0>

6. *Nesterov S.V., Chesnokov Yu.M., Kamyshinsky R.A. et al.* // *Nanotechnologies in Russia.* 2020. V. 15. P. 83. <https://doi.org/10.1134/S1995078020010139>

7. *Hisabori T., Sunamura E.I., Kim Y., Konno H.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 19. P. 1846. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5044>

8. *Yang J.-H., Williams D., Kandiah E. et al.* // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01221-8>

9. *Fischer S., Gräber P., Turina P.* // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 30157. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.39.30157>

10. *Bason J.V., Montgomery M.G., Leslie A.G.W., Walker J.E.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. V. 111. P. 11305. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411560111>

11. *Boyer P.D.* // *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1993. V. 1140. P. 215. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90063-L](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90063-L)

12. *Walker J.E.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998. V. 37. P. 2308. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980918\)37:17<2308::AID-ANIE2308>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980918)37:17<2308::AID-ANIE2308>3.0.CO;2-W)

13. *Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K.* // *Nature.* 1997. V. 386. P. 299. <https://doi.org/10.1038/386299a0>

14. *Sambongi Y., Iko Y., Tanabe M. et al.* // *Science.* 1999. V. 286. P. 1722. <https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1722>

15. *Itoh H., Takahashi A., Adachi K. et al.* // *Nature.* 2004. V. 427. P. 465. <https://doi.org/10.1038/nature02212>

16. *Adachi K., Oiwa K., Yoshida M. et al.* // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 1022. <https://doi.org/10.1038/ncomms2026>

17. *Düser M.G., Zarrabi N., Cipriano D. J. et al.* // *EMBO J.* 2009. V. 28. P. 2689. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.213>

18. *Guo H., Rubinstein J.L.* // *Structure of ATP synthase under strain during catalysis.* 2022. P. 2022.01.24.477618. <https://doi.org/10.1101/2022.01.24.477618>

19. *Murphy B.J., Klusch N., Langer J. et al.* // *Science.* 2019. V. 364. P. eaaw9128. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9128>

20. *Sobti M., Ueno H., Noji H., Stewart A.G.* // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 4690. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25029-0>



21. *Watanabe R., Tabata K.V., Iino R. et al.* // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 1.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2631>
22. *Yanagisawa S., Frasch W.D.* // eLife. 2021. V. 10. P. E70016.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.70016>
23. *Нестеров С.В., Смирнова Е.Г., Ягужинский Л.С.* // Биохимия. 2022. Т. 87. С. 216.  
<https://doi.org/10.31857/S0320972522020063>
24. *Antonenko Y.N., Kovbasnjuk O.N., Yaguzhinsky L.S.* // Biochim. Biophys. Acta. Biomembr. 1993. V. 1150. P. 45.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90119-K](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90119-K)
25. *Yurkov V.I., Fadeeva M.S., Yaguzhinsky L.S.* // Biochem. Mosc. 2005. V. 70. P. 195.  
<https://doi.org/10.1007/s10541-005-0101-8>
26. *Моисеева В.С., Мотовилов К.А., Лобышева Н.В. и др.* // Докл. РАН. 2011. Т. 438.
27. *Teschke O., Ceotto G., de Souza E.F.* // Phys. Rev. E. 2001. V. 64. P. 011605.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.64.011605>
28. *Prats M., Tocanne J.F., Teissié J.* // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. P. 663.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08975.x>
29. *Krasinskaya I.P., Lapin M.V., Yaguzhinsky L.S.* // FEBS Lett. 1998. V. 440. P. 223.
30. *Еремеев С.А., Ягужинский Л.С.* // Биохимия. 2015. V. 80. P. 682.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297915050089>
31. *Hyman A.A., Weber C.A., Jülicher F.* // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2014. V. 30. P. 39.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013325>
32. *Turoverov K.K., Kuznetsova I.M., Fonin A.V. et al.* // Trends Biochem. Sci. 2019. V. 44. P. 716.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.03.005>
33. *Lepeshkin V.V.* // Kolloidchemie des Protoplasmas. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1924.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-02090-6>
34. *Wilson E.B.* // Science. 1899. V. 10. P. 33.  
<https://doi.org/10.1126/science.10.237.33>
35. *Brangwynne C.P., Eckmann C.R., Courson D.S. et al.* // Science. 2009. V. 324. P. 1729.  
<https://doi.org/10.1126/science.1172046>
36. *Zaslavsky B.Y., Uversky V.N.* // Biochemistry. 2018. V. 57. P. 2437.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01215>
37. *Nesterov S.V., Ilyinsky N.S., Uversky V.N.* // Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res. 2021. V. 1868. P. 119102.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2021.119102>
38. *Nesterov S., Chesnokov Y., Kamtyshinsky R. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22031462>
39. *Козлова М.В., Грамадский К.Б., Солодовникова И.М. и др.* // Биофизика. 2003. Т. 48. С. 44.
40. *Polya G.M., Jagendorf A.T.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1969. V. 36. P. 696.  
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90362-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90362-3)
41. *Zolotareva E.K., Oranasenko V.K., Zakharov S.D., Kuzmina V.P.* // FEBS Lett. 1986. V. 197. P. 125.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80311-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80311-8)
42. *Золотарева Е.К., Гаспарян М.Э., Ягужинский Л.С.* // Биологические мембраны. 1989. Т. 6. С. 819.
43. *Гаспарян М.Э., Золотарева Е.К., Ягужинский Л.С.* // Биологические мембраны. 1989. Т. 6. С. 814.
44. *Zolotareva E.K., Gasparyan M.E., Yaguzhinsky L.S.* // FEBS Lett. 1990. V. 272. P. 184.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80479-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80479-3)
45. *Ponomarenko S., Volfson I., Strotmann H.* // FEBS Lett. 1999. V. 443. P. 136.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01681-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01681-0)
46. *Опанасенко В.К.* // Дис. “Роль ионогенных групп белков в структурно-функциональной организации тилакоидных мембран хлоропластов”... доктора наук. Институт почвоведения и фотосинтеза РАН. 1996.
47. *Zhou A., Rohou A., Schep D.G. et al.* // eLife. 2015. V. 4. P. E10180.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.10180>
48. *Wikström M., Sharma V.* // Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg. 2018. V. 1859. P. 692.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.03.009>
49. *Rich P.R., Maréchal A.* // J. R. Soc. Interface. 2013. V. 10. P. 20130183.  
<https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0183>