

УДК 577.151.6

## АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ $\beta$ 139, $\beta$ 189 И $\beta$ 319 $H^+$ - $F_0F_1$ -АТФ-СИНТАЗЫ *Escherichia coli*: ВЛИЯНИЕ НА АДФ-ИНГИБИРОВАНИЕ\*

© 2019 А.С. Лапашина<sup>1,2</sup>, Т.Е. Шугаева<sup>1</sup>, К.М. Березина<sup>1</sup>,  
Т.Д. Холина<sup>1</sup>, Б.А. Фенюк<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: feniouk@fbb.msu.ru

Поступила в редакцию 09.10.2018

После доработки 06.11.2018

Принято к публикации 06.11.2018

Протон-транслоцирующая  $F_0F_1$ -АТФ-синтаза (АТФаза F-типа, F-АТФаза или  $F_0F_1$ ), обнаруженная в митохондриях, хлоропластах и большинстве зубактерий, является одним из ключевых ферментов биоэнергетики и осуществляет синтез/гидролиз АТФ, сопряженный с транспортом протонов через мембрану. АТФазная активность фермента подавляется в отсутствие протондвижущей силы несколькими регуляторными механизмами. Наиболее консервативным из этих механизмов, обнаруженным во всех исследованных ферментах, является аллостерическое ингибирование гидролиза АТФ комплексом MgАДФ (АДФ-ингибирование). Когда MgАДФ связывается без фосфата в каталитическом сайте, фермент переходит в неактивное состояние, а MgАДФ оказывается замкнут в каталитическом сайте и не обменивается со средой. Степень выраженности АДФ-ингибирования различается у  $F_0F_1$  из разных организмов. У фермента из *Escherichia coli* АДФ-ингибирование выражено слабо, и, в отличие от наблюдаемого на  $F_0F_1$  из других организмов, усиливается, а не ослабляется фосфатом. В данной работе, с помощью сайт-направленного мутагенеза  $F_0F_1$  *E. coli*, была изучена роль аминокислотных остатков  $\beta$ 139,  $\beta$ 158,  $\beta$ 189 и  $\beta$ 319 в процессе АДФ-ингибирования и влияние на него протондвижущей силы. Тип аминокислотного остатка в этих позициях отличается между  $F_0F_1$  бета- и гамма-протеобактерий (включая *E. coli*) и ферментами прочих зубактерий, хлоропластов и митохондрий. Замена  $\beta$ N158L не повлияла на активность фермента. Замены  $\beta$ F139Y,  $\beta$ F189L и  $\beta$ V319T мало повлияли на АТФазную активность при гидролизе 1 мМ АТФ. Однако в смеси АТФ и АДФ активность мутантных ферментов снижалась слабее, чем в  $F_0F_1$  дикого типа. Кроме того, мутации  $\beta$ F189L и  $\beta$ V319T привели к ослаблению ингибирования АТФазной активности фермента фосфатом в присутствии АДФ. Мы предполагаем, что остатки  $\beta$ 139,  $\beta$ 189 и  $\beta$ 319 задействованы в механизме АДФ-ингибирования и его модуляции фосфатом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** АТФ-синтаза, F-АТФаза, АДФ-ингибирование, регуляция, *Escherichia coli*,  $F_0F_1$ .

DOI: 10.1134/S0320972519040080

$F_0F_1$ -АТФ-синтаза представляет собой мембранный мультисубъединичный фермент, который катализирует синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата ( $\Phi_H$ ). Фермент обнаружен в бактериальной плазматической мембране, во внутренней мембране митохондрий и в тилакоидной мембране в хлоропластах. Гидрофильная

каталитическая  $F_1$ -часть фермента несет сайты, связывающие нуклеотиды, и осуществляет синтез/гидролиз АТФ. Гидрофобная  $F_0$ -часть находится в мембране и отвечает за перенос протонов. Комплекс  $F_1$  *Escherichia coli* состоит из пяти типов субъединиц в стехиометрии  $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$ , а комплекс  $F_0$  состоит из трех типов субъединиц в стехиометрии  $a_1b_2c_{10}$  [1]. Синтез/гидролиз АТФ, катализируемый  $F_1$ , и сопряженный с ним транспорт  $H^+$  через  $F_0$  реализуются с помощью ротационного механизма [2–4]. Под действием протондвижущей силы, создаваемой ферментами дыхательной и фотосинтетической цепи переноса электронов,  $H^+$  переносятся через мембрану в области контакта субъединицы *a* и коль-

Принятые сокращения: СБЧ – суббактериальные мембранные частицы,  $\Phi_H$  – неорганический фосфат.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-283, 31.12.2018.

\*\* Адресат для корреспонденции.

цевого олигомера  $c_{10}$  и индуцируют вращение последнего относительно  $ab_2$ -комплекса. В свою очередь,  $ab_2$ -комплекс связан с  $\alpha_3\beta_3\delta$ -комплексом, а субъединицы  $\gamma$  и  $\epsilon$  связаны с  $c_{10}$ -кольцом. В результате протонный транспорт оказывается сопряжен с вращением комплекса  $c_{10}\gamma\epsilon$ , называемого «ротор», относительно комплекса  $ab_2\alpha_3\beta_3\delta$ . Вращение субъединицы  $\gamma$  внутри гексамера  $\alpha_3\beta_3$  индуцирует последовательные конформационные изменения, которые приводят к связыванию АДФ и  $\Phi_H$ , синтезу и высвобождению АТФ. Если протондвижущая сила падает ниже термодинамического порога для синтеза АТФ, реакция обращается. Гидролиз АТФ вызывает конформационные изменения в гексамере  $\alpha_3\beta_3$ , которые приводят к вращению  $\gamma\epsilon ac_{10}$ -комплекса. Вращение  $c_{10}$ -кольца относительно субъединицы  $a$  приводит к трансмембранному переносу  $H^+$  и генерации протондвижущей силы.

АТФазная активность  $F_0F_1$  может играть важную роль в условиях, когда активность первичных генераторов протондвижущей силы падает. Примерами таких условий являются темное время для фотосинтетических бактерий и растений, недостаток кислорода для аэробных бактерий и митохондрий. В таких условиях  $F_0F_1$  остается единственным ферментом, способным поддерживать (за счет гидролиза АТФ) протондвижущую силу, необходимую для ряда физиологически важных процессов. Однако, когда концентрация внутриклеточного АТФ значительно уменьшается, или когда проницаемость мембраны для протонов увеличивается, например, в присутствии разобщителей-протонофоров или токсинов, катализируемый  $F_0F_1$  гидролиз АТФ может исчерпать внутриклеточные запасы АТФ и потому может представлять угрозу для клетки. В этой связи неудивительно, что АТФазная активность  $F_0F_1$  регулируется с помощью нескольких механизмов [5].

Неконкурентное ингибирование гидролиза АТФ с помощью  $MgADP$  является наиболее консервативным из этих механизмов и известно для всех изученных F-АТФаз [6–12]. Если  $MgADP$  оказывается связан в каталитическом сайте без  $\Phi_H$ , то фермент может претерпеть конформационный переход в неактивное состояние. В митохондриальных, хлоропластных и многих бактериальных АТФ-синтазах  $\Phi_H$  противодействует этому переходу. Активация ингибированного  $F_0F_1$  требует протондвижущей силы, причем ее величина должна быть сравнима или превышать уровень, необходимый для синтеза АТФ. Предположительно, индуцированное протондвижущей силой вращение субъединицы  $\gamma$  приводит к переходу каталитического сайта со связанным ингибирующим АДФ в открытое состояние,

АДФ высвобождается, и фермент вновь активируется. С другой стороны, умеренная энергизация мембраны также противодействует АДФ-ингибированию за счет увеличения сродства каталитических сайтов к  $\Phi_H$ , тем самым снижая вероятность того, что АДФ будет связан в каталитическом сайте без  $\Phi_H$  [13, 14].

Однако картина АДФ-ингибирования в  $F_0F_1$  из *E. coli*, по-видимому, отличается от описанной выше. Во-первых, фермент *E. coli* менее уязвим для ингибирования  $MgADP$ , чем другие АТФ-синтазы. Во-вторых, у фермента *E. coli* АДФ-ингибирование не предотвращается, а усиливается неорганическим фосфатом [11, 15].

Ранее нами было показано, что на свойства АДФ-ингибирования влияет остаток в положении, соответствующем  $\beta 249$  фермента *E. coli*. В этом положении у бета-протеобактерий и гамма-протеобактерий (включая *E. coli*) присутствует лейцин, а у ферментов митохондрий, хлоропластов и большинства остальных эубактерий — глутамин. Замена глутамина на лейцин резко ослабила АДФ-ингибирование в  $F_0F_1$  из термофильной бактерии *Bacillus PS3* sp. [16], а обратная замена  $\beta L249Q$  усилила АДФ-ингибирование в ферменте *E. coli* и поменяла на противоположный эффект  $\Phi_H$ : в мутантном  $F_0F_1$  фосфат не усиливал, а ослаблял АДФ-ингибирование [17].

В данной работе мы изучили роль в АДФ-ингибировании еще нескольких позиций в субъединице  $\beta$ , в которых тип аминокислотного остатка различается в  $F_0F_1$  бета-протеобактерий и гамма-протеобактерий и в АТФ-синтазах митохондрий, хлоропластов и большинства остальных эубактерий.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Построение множественного выравнивания  $\beta$ -субъединиц  $F_0F_1$ .** Для построения выравнивания был выбран набор полностью секвенированных 711 геномов архей и бактерий, взятый за основу последней версии базы Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG) [18]. Также к базе были добавлены последовательности митохондриального (бык, пекарские дрожжи) и хлоропластного (шпинат) ферментов. Для поиска по базе белков использовались профили скрытых марковских моделей (НММ), составленные по данным последней версии базы COG. НММ-профили были получены как описано в статье Dibrova et al. [19] и использовались при поиске по базе программой НММscan 3.1 из пакета НММер3 [20]. Поскольку при поиске по НММ-профилю часто находятся родственные белки (например,  $\alpha$ -субъединицы при поиске по про-

филю  $\beta$ ), результаты были отобраны по порогу E-value. Для субъединицы  $\beta$  был принят порог  $7,7 \times 10^{-103}$ , после которого наблюдался скачок в значениях E-value, отделяющий искомую субъединицу от родственных.

Подобным образом также были отобраны остальные субъединицы  $F_0F_1$ . Получившиеся наборы субъединиц были разбиты на потенциально принадлежащие АТФ-синтазам F-типа и N-типа. Последними считались опероны, содержащие все субъединицы  $F_1$  и  $F_0$ , кроме  $\delta$ . Субъединицы  $\beta$ , принадлежащие АТФ-синтазам F-типа, были взяты за основу для множественного выравнивания. Множественное выравнивание строилось программой MUSCLE 3.8 [21]. Для визуализации и анализа выравнивания использовалась программа Jalview 2.10.5 [22].

**Сайт-направленный мутагенез.** Мутагенез производили на плазмиде pFV2, содержащей *unc*-оперон (кодирует *a*, *b*, *c*,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  субъединицы АТФ-синтазы *E. coli*) и ген устойчивости к ампициллину. В последовательности генов АТФ-синтазы на этой плазмиде введен гистидиновый тэг на N-конце субъединицы  $\beta$ , а цистеин-кодирующие кодоны (кроме цистеина *b21*) заменены на кодоны аланинов. Показано, что эти замены не оказывают значительного влияния на активность [23]. Фермент, экспрессируемый с плазмиды pFV2, в дальнейшем будет называться диким типом.

Мутации в  $\beta$ -субъединицу вводили с помощью полимеразной цепной реакции с мутагенными праймерами, используя pFV2 дикого типа в качестве матрицы. Вкратце, два праймера, один из которых содержал нужную мутацию, использовали для синтеза олигонуклеотида (мегапраймера) размером 200–400 п.о., несущего мутацию и ближайший сайт эндонуклеазы рестрикции, уникальный для pFV2. Затем третий праймер использовали для расширения фрагмента с мутацией, чтобы фланкировать ее другим уникальным сайтом рестрикции. Фрагмент клонировали в вектор pBluescript II SK (–), секвенировали и переносили в pFV2. Клонирование проводили в штамме XL-1 Blue *E. coli*. Затем pFV2 дикого типа или с внесенной мутацией экспрессировали в штамме *E. coli* BW25113 ( $\Delta$ atpB-atpC), в котором большая часть оперона, кодирующего АТФ-синтазу, была заменена касетой резистентности к канамицину [16].

В таблице приведены праймеры («ДНК-синтез», Россия), которые были использованы для внесения мутаций.

**Получение вывернутых суббактериальных частиц.** Суспензию 1 мл ночной культуры *E. coli* инокулировали в 600 мл среды LB («Amresco», США) с добавлением ампициллина (100 мг/л) и

Последовательности праймеров, использованных для введения мутаций

| Аминокислотная замена | 5'–3'-последовательность праймеров |
|-----------------------|------------------------------------|
| $\beta$ F139Y         | AGATCTGATGGCTCCGTACGCTAAGGG        |
| $\beta$ N158L         | AGGTAACCGTACTGATGATGGAGC           |
| $\beta$ F189L         | CATTCGTGGTACAGGTCGTTACCCTC         |
| $\beta$ V319T         | ACAGTACTGAGCCGTCAGATCGCG           |

растили 18–20 ч при 37 °С в колбах Эрленмейера объемом 2 литра при перемешивании. Полученную суспензию (общий объем жидкой культуры составлял 3 литра) центрифугировали 10 мин (ротор JA-10, 7000 об/мин) («Beckman Coulter», США) при комнатной температуре. Сырой вес клеток, полученных в результате осаждения, составлял 10–20 г. Клетки собирали центрифугированием (10 000 g, 10 мин), промывали буфером, содержащим 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (w/v) глицерина, ресуспендировали в 25–30 мл того же буфера и разрушали с помощью двух последовательных пассажей на Френч-прессе («SLM Aminco», США) при давлении 1000 PSI. Разрушение клеток и все последующие манипуляции выполнялись при 4 °С или на льду. Неразрушенные клетки и крупные обломки собирали центрифугированием при 13 700 g, 30 мин, и отбрасывали. Супернатант центрифугировали при 390 000 g в течение 1 ч для осаждения вывернутых суббактериальных мембранных частиц (СБЧ), которые затем повторно суспендировали в 25 мл того же буфера и снова центрифугировали при тех же условиях. Отмытые таким образом СБЧ ресуспендировали в 1–1,5 мл того же буфера. Затем СБЧ аликвотировали по 50 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С. Концентрацию белка в мембранных частицах определяли с помощью коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay kit («Thermo Scientific», США) с использованием растворов бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. В норме концентрация белка в суспензии СБЧ составляла 20–80 мг/мл.

**Измерение АТФазной активности.** АТФазную активность СБЧ измеряли с помощью регистрации закисления среды [24] по изменению поглощения pH-индикатора фенолового красного (щелочной пик 558 нм, изобестическая точка 477 нм).

При измерениях на планшетном ридере CLARIOstar («BMG Labtech», Германия) суспензию мембранных частиц в буфере pheRed, содержащем 2 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 30 мкМ фенолового красного, pH 8,0, по-

мешали в 96-луночный планшет («Greiner Bio-One», США) по 150 мкл в лунку. Для измерений в присутствии  $\Phi_H$  использовали буфер pheRed с добавлением  $K_2HPO_4$  до 6 мМ. Измерения проводили при температуре 37 °С. В каждой лунке плашки осуществлялась следующая последовательность действий: 3–5 с вели измерение поглощения (при 558 и 477 нм), далее вводили 150 мкл буфера, содержавшего АТФ или смесь АТФ/АДФ (2 мМ HEPES, 1 мМ  $MgCl_2$ , 100 мМ KCl, 2 мМ АТФ или АТФ/АДФ в суммарной концентрации 2 мМ, 30 мкМ фенолового красного, рН 8,0), затем вновь регистрировали поглощение в течение 30–50 с. Далее дважды добавляли по 30 нмоль NaOH для того, чтобы установить соответствие между изменением поглощения и изменением рН пробы (калибровочные добавки). Расчет АТФазной активности производили с помощью программы CLARIOstar – Data Analysis («BMG Labtech», Германия) и обработки данных с помощью программы, написанной на python 2.7 («Python Software Foundation», США).

При измерениях на двулучевом спектрофотометре DW-2000 («SLM Aminco», США) суспензию мембранных частиц в буфере pheRed помещали в пластиковую кювету объемом 3 мл. Измерение поглощения проводили при 558 и 477 нм. Снимали базовую линию, затем реакцию гидролиза начинали добавлением АТФ или смеси АТФ/АДФ, рН 7,9 (конечная суммарная концентрация в кювете 1 мМ). Делали несколько калибровочных добавок по 3 мкл 100 мМ раствора NaOH до конечной концентрации 100 мкМ. Измерения проводили при 37 °С. Анализ кривых и расчет активности производили с помощью программного пакета Origin («OriginLab», США).

**Измерение АТФ-зависимого протонного транспорта.** Для измерения АТФ-зависимого протонного транспорта был использован флуоресцентный краситель 9-амино-6-хлоро-2-метоксиакридин (АСМА) («Sigma-Aldrich», США), который в отсутствие градиента рН на мембране находится в растворе и флуоресцирует, а при возникновении  $\Delta pH$  связывается с мембранами, что приводит к тушению флуоресценции [25]. Измерение флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Fluogomax-3 («Horiba Jobin Yvon», Япония) в 1 см акриловых кюветах при длинах волн возбуждения и эмиссии 410 и 480 нм соответственно. Буфер содержал 10 мМ HEPES, рН 7,5, 100 мМ KCl, 5 мМ  $MgCl_2$ . Концентрация АСМА в кювете составляла 0,3 мкг/мл. Реакцию инициировали добавлением в кювету АТФ до концентрации 500 мкМ. Измерения проводились при комнатной температуре.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для поиска аминокислотных остатков, которые могут играть роль в механизме АДФ-ингибирования, мы провели биоинформатический анализ последовательностей  $\beta$ -субъединиц прокариотических  $F_0F_1$ . Для этого использовался набор из 711 геномов архей и бактерий, взятый за основу последней версии базы Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG) [18], к которому были добавлены последовательности митохондриального (бык, пекарские дрожжи) и хлоропластного (шпинат) ферментов. Из набора найденных в геномах  $F_0F_1$  были отсеяны последовательности N-АТФаз, роль которых, по-видимому, связана с откачиванием ионов натрия, а не с синтезом АТФ и АТФ-зависимой генерацией протондвижущей силы [26]. У архей и некоторых эубактерий в геноме отсутствует  $F_0F_1$ , и в результате анализируемый набор содержал 492 эубактериальных белка, 2 митохондриальных и 1 хлоропластный. На рис. 1 представлено фрагментарное выравнивание некоторых из проанализированных белков.

Анализ выравнивания показал, что в исследованном наборе последовательностей у всех бета-протеобактерий (34 вида) и гамма-протеобактерий (62 вида, плюс 2 штамма *E. coli*) в позициях, соответствующих  $\beta 139$ ,  $\beta 158$ ,  $\beta 189$  и  $\beta 319$  фермента *E. coli*, высоко консервативными являются фенилаланин, аспарагин, фенилаланин и валин, а у прочих проанализированных эубактериальных белков и у митохондриального и хлоропластного ферментов – тирозин, лейцин, лейцин и треонин.

Мы предположили, что эти остатки могут, подобно остатку  $\beta 249$  *E. coli* [17], влиять на степень выраженности и характеристики АДФ-ингибирования фермента. С помощью сайт-специфического мутагенеза были сделаны замены каждого из этих остатков на соответствующую ему аминокислоту митохондриального/хлоропластного фермента (мутации  $\beta F139Y$ ,  $\beta N158L$ ,  $\beta F189L$  и  $\beta V319T$ ). Кроме того, был получен двойной мутант  $\beta F139Y + \beta V319T$ . Мутантные белки, а также белок дикого типа экспрессировались с плазмиды pFV2 в штамме *E. coli*, у которого оперон АТФ-синтазы был удален из генома. Из клеток были получены суббактериальные инвертированные мембранные частицы, для которых были проведены измерения АТФазной активности. Для выяснения влияния протондвижущей силы на активность, к СБЧ добавляли смесь валиномицина и нигерицина, которая в присутствии ионов калия деэнергизует мембрану. Кроме того, было изучено влияние 3 мМ  $\Phi_H$  на АТФазную активность. Для образцов с мута-

|  | 139       | 158     | 189  | 249   | 319   |       |         |        |      |         |       |        |         |         |       |         |       |
|--|-----------|---------|------|-------|-------|-------|---------|--------|------|---------|-------|--------|---------|---------|-------|---------|-------|
| 1. <i>Escherichia coli</i> str. K-12 MG1655        | 134 DLMCF | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI | 163-184 | REGNDF | YHEM | 193-244 | IYRYT | LAGTEV | 254-312 | FAHLDAT | VVLSR | 323     |       |
| 2. <i>Shigella dysenteriae</i> 1617                | DLMCF     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 3. <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium str. LT2 | DLMCF     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 4. <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047          | DLMCF     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 342                | DLMCF     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 6. <i>Erwinia amylovora</i> ATCC 49946             | DLMCF     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 7. <i>Yersinia pestis</i> CO92                     | DLIIC     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 8. <i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20           | DLIIC     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 9. <i>Legionella pneumophila</i> LPE509            | DLLCF     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 10. <i>Azotobacter vinelandii</i> DJ               | DLLVC     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 11. <i>Vibrio cholerae</i> str. N16961             | DLICF     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 12. <i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259   | DLIIM     | FAKGGK  | VGLF | GGAGV | GKTVN | MMELI |         | REGNDF | YHEM |         | IYRYT | LAGTEV |         | FAHLDAT | VVLSR |         |       |
| 13. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                | DLLAP     | YARGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | QELI   |      | REGNDLY | REM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 14. <i>Bos taurus</i>                              | DLLAP     | YAKGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEI    |      | REGNDLY | HEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 15. <i>Spinacia oleracea</i>                       | DLLAP     | YRRGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEI    |      | REGNDLY | MEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 16. <i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath      | DLLCF     | FARGGK  | T    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEFM   |      | REGHEL  | WREL  |        | VFRFVQ  | AGSEI   |       | LSHLDT  | VVLSR |
| 17. <i>Chlorobium tepidum</i> TLS                  | DLLV      | LERGGK  | A    | GLF   | GGAGV | GKTVL | L       | TEMI   |      | REGHEL  | YRDM  |        | IFRFTQ  | AGSEI   |       | FSHLSA  | VVLSR |
| 18. <i>Brucella melitensis</i> bv. 1 str. 16M      | DLLAP     | YAKGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEI    |      | REGNDLY | HEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 19. <i>Caulobacter crescentus</i> CB15             | DLMCF     | YTKGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEI    |      | REGNDLY | HEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 20. <i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222         | DLLAP     | YSKGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEI    |      | REGNDLY | HEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 21. <i>Alkaliphilus metallodigens</i> QYMF         | DLLAP     | YARGGK  | V    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEI    |      | REGNDLY | HEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 22. <i>Heliobacterium modesticaldum</i> Ice1       | DLLAP     | YAKGGK  | V    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | QELI   |      | REGNDLY | NEF   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 23. <i>Geobacillus thermoleovorans</i> CCB US3 UF5 | DLLAP     | YIKGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | QELI   |      | REGNDLY | HEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FSHLDA  | VVLSR |
| 24. <i>Cyanobacterium aponinum</i> PCC 10605       | DLLT      | YRQGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEI    |      | REGNDLY | NEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDG  | VVLSR |
| 25. <i>Acetobacterium woodii</i> DSM 1030          | DLLI      | CFYRGGK | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | QELI   |      | REGNDLY | YEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 26. <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122            | DLLT      | YRQGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEI    |      | REGNDLY | NEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDG  | VVLSR |
| 27. <i>Bacillus anthracis</i> str. Ames            | DLLAP     | YIKGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | QELI   |      | REGNDLY | HEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 28. <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312              | DLLT      | YRQGGK  | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | MEI    |      | REGNDLY | NEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDG  | VVLSR |
| 29. <i>Mycoplasma genitalium</i> G37               | DLLT      | YVYRGGK | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | QELI   |      | REGNDLY | YEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FTHLDA  | VVLSR |
| 30. <i>Lactobacillus plantarum</i> ZJ316           | DLLAP     | YVYRGGK | I    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | QELI   |      | REGNDLY | FEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDAT | VVLSR |
| 31. <i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS           | DLLAP     | YLKGGK  | V    | GLF   | GGAGV | GKTVL | I       | QELI   |      | REGNDLY | WEM   |        | IFRFTQ  | AGSEV   |       | FAHLDST | VVLSR |

Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей участков субъединицы  $\beta$  АТФ синтазы. 1–12 – Гамма-протеобактерии и бета-протеобактерии, 13–14 – митохондрии; 15 – хлоропласты, 16–31 – эубактерии, не относящиеся к гамма-протеобактериям и бета-протеобактериям. Нумерация остатков в верхней строке соответствует субъединице  $\beta$  АТФ-синтазы *E. coli*. Оттенки серого соответствуют степени консервативности аминокислотных остатков. Черным выделены 4 позиции, изучавшиеся в данной работе, и позиция, изученная ранее ( $\beta$ 249)

цией  $\beta$ N158L мы не обнаружили достоверных отличий по АТФазной активности от дикого типа ни в одном из проведенных экспериментов. Результаты измерений по остальным исследованным мутантам представлены на рис. 2.

Во всех четырех исследованных мутантах АТФазная активность была сравнима с таковой у дикого типа. Наблюдаемые отличия абсолютных значений (1,94–4,02 ед./мг белка) могут

объясняться как небольшим влиянием мутации на активность, так и разбросом в уровне экспрессии  $F_0F_1$  в разных образцах.  $\Phi_H$  в концентрации 3 мМ снижал АТФазную активность во всех исследованных штаммах, однако в мутанте  $\beta$ F139Y этот эффект был менее выражен (~30%, в то время как в образцах дикого типа и остальных мутантов – 60–80%). Добавка разбавителей, резко повышающая проводимость мембра-

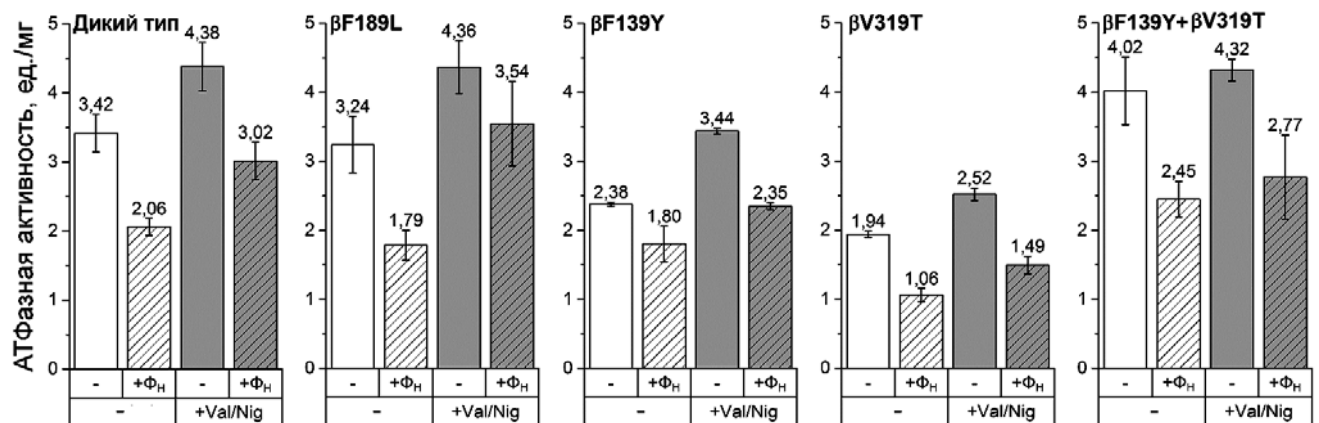


Рис. 2. Влияние разбавителя и фосфата на АТФазную активность СБЧ дикого типа и мутантов  $\beta$ F139Y,  $\beta$ F189L,  $\beta$ V319T и  $\beta$ F139Y +  $\beta$ V319T. Измерения проводились на СБЧ с АТФ-синтазой дикого типа (WT), а также с мутантными белками ( $\beta$ F139Y,  $\beta$ F189L,  $\beta$ V319T и  $\beta$ F139Y +  $\beta$ V319T). Активность измерялась при концентрации АТФ 1 мМ как указано в разделе «Методы исследования». Для каждого штамма измерялась активность без добавок, в присутствии разбавителя (+Val/Nig, валиномицин и нигерин в концентрациях 500 нМ каждый), фосфата (+ $\Phi_H$ , концентрация 3 мМ) или обеих добавок. Средние значения активностей по результатам 5–8 измерений указаны над соответствующими колонками, разброс представляет собой стандартное отклонение. Единица активности соответствует гидролизу 1  $\mu$ моль АТФ в минуту в расчете на мг мембранного белка

ны для протонов и приводящая к исчезновению протондвижущей силы, достоверно стимулировала АТФазную активность во всех образцах, кроме СБЧ из мутанта  $\beta F139Y + \beta V319T$ , где эффект был в пределах ошибки измерения. Добавление  $\Phi_H$  на фоне разобщителя также снижало скорость гидролиза АТФ во всех образцах, но в СБЧ из мутанта  $\beta F189L$  эффект был менее выражен (данные не приведены).

Для дальнейшего прояснения влияния исследуемых остатков на АДФ-ингибирование  $F_0F_1$ , АТФазная активность каждого мутанта была измерена в присутствии АДФ. К образцам СБЧ добавляли либо АТФ (до концентрации 1 мМ), либо смесь АТФ и АДФ (до концентрации 750/250 или 400/600 мкМ). Также было исследовано влияние протондвижущей силы и  $\Phi_H$  на АТФазную активность в присутствии АДФ. Результаты экспериментов представлены на рис. 3–6.

В отсутствие добавок АДФ подавлял активность СБЧ мутанта  $\beta F139Y$  меньше, чем в случае дикого типа (рис. 3). В отсутствие протондвижущей силы этот эффект был еще более выражен. Однако, в присутствии 3 мМ  $\Phi_H$  эффекта не наблюдали, как в сопряженных, так и в разобренных СБЧ. Следует также отметить, что, как и в диком типе, в образце  $\beta F139Y$   $\Phi_H$  значительно сильнее подавлял АТФазную активность в присутствии АДФ.

Тот же набор экспериментов был проведен с СБЧ из мутанта  $\beta F189L$ . В отсутствие разобщителя и  $\Phi_H$  снижение отношения АТФ/АДФ одинаково влияло на АТФазную активности образца  $\beta F189L$  и дикого типа (рис. 4). Однако, как в присутствии разобщителя, так и в присутствии 3 мМ  $\Phi_H$ , активность СБЧ из мутанта  $\beta F189L$  в смеси 750 мкМ АТФ и 250 мкМ АДФ была достоверно выше, чем таковая СБЧ дикого типа. При этом, при более низком отношении АТФ/АДФ этот эффект был менее выражен.

На СБЧ из мутанта  $\beta V319T$  в отсутствие  $\Phi_H$  и разобщителя также не наблюдали значительных различий в изменении АТФазной активности при снижении отношения АТФ/АДФ по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 5). Но в присутствии разобщителя и/или 3 мМ  $\Phi_H$  активность СБЧ  $\beta V319T$  в ответ на повышение концентрации АДФ снижалась значительно слабее, чем в СБЧ дикого типа. При этом данный эффект был более выражен при низком значении отношения АТФ/АДФ.

Наконец, измерения на СБЧ из мутанта  $\beta F139Y + \beta V319T$  показали, что отношение АТФ/АДФ оказывает сходный эффект на АТФазную активность сопряженных мембран дикого типа и мутанта, как в присутствии, так и в отсутствие  $\Phi_H$  (рис. 6). Однако в отсутствие протон-

движущей силы при добавке разобщителя, АТФазная активность СБЧ дикого типа оказалась более чувствительна к снижению отношения АТФ/АДФ, чем таковая в случае СБЧ из мутанта  $\beta F139Y + \beta V319T$ .

Помимо эффектов на АТФазную активность, изучаемые мутации могли оказать влияние на сопряжение между гидролизом АТФ и протонным транспортом. Хотя добавка разобщителя стимулировала АТФазную активность СБЧ дикого типа и одиночных мутантов, что указывает на наличие сопряжения, для непосредственной проверки были поставлены опыты по

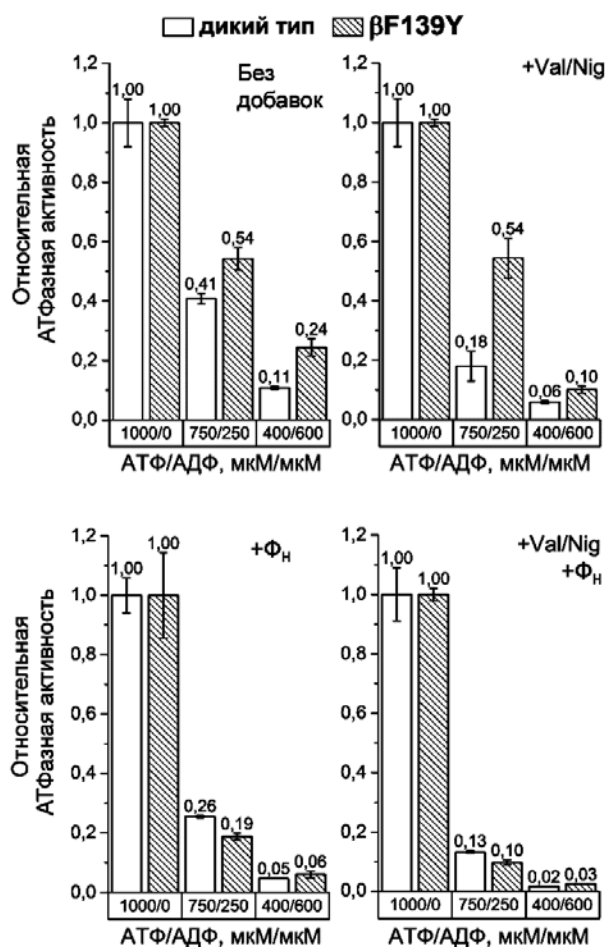


Рис. 3. Относительная АТФазная активность СБЧ дикого типа и мутанта  $\beta F139Y$  при разном соотношении АТФ/АДФ. Реакция запускалась добавкой АТФ (конечная концентрация 1 мМ) или смеси АТФ и АДФ (конечные концентрации 750 и 250 мкМ, или 400 и 600 мкМ). Измерялась активность без добавок, в присутствии разобщителя (+Val/Nig, валиномицин и нигеридин в концентрациях 500 нМ каждый), фосфата (+ $\Phi_H$ , концентрация 3 мМ), или обоих добавок вместе. Средние значения активностей по результатам 5–8 измерений указаны над соответствующими колонками, разброс представляет собой стандартное отклонение. За единицу принималась активность без добавок при гидролизе 1 мМ АТФ

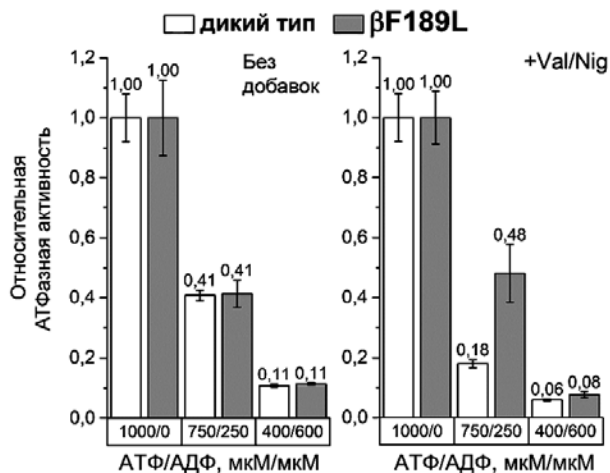


Рис. 4. Относительная АТФазная активность СБЧ дикого типа и мутанта  $\beta F189L$  при разном соотношении АТФ/АДФ. Измерения проводились так же, как для мутанта  $\beta F139Y$  на рис. 3

измерению АТФ-зависимого протонного транспорта. Как показано на рис. 7, в ответ на добавку АТФ наблюдали гашение флуоресценции индикатора АСМА, вызываемое возникновением градиента рН на мембране, как в СБЧ дикого типа, так и в изученных мутантах. Добавка разобщителя после АТФ приводила к рассеиванию градиента и увеличению флуоресценции до исходного уровня.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У  $F_0F_1$  из *E. coli*, отличающегося от прочих изученных АТФ-синтаз слабо выраженным АДФ-ингибированием [12] и усилением этого ингибирования  $\Phi_H$  [11, 15], в положении  $\beta 249$  находится лейцин, в то время как у прочих изученных ферментов, имеющих более сильное АДФ-ингибирование, которое ослабляется фосфатом

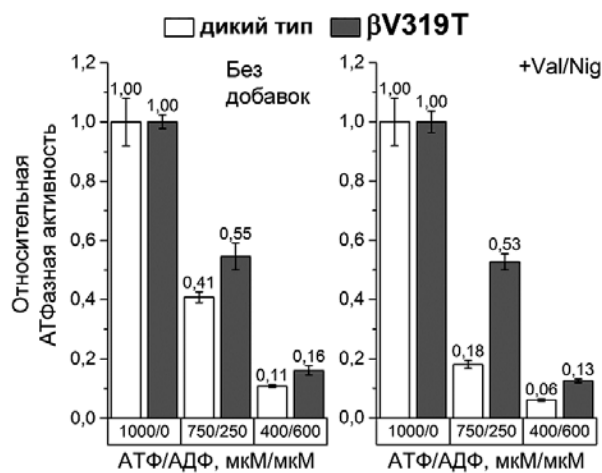


Рис. 5. Относительная АТФазная активность СБЧ дикого типа и мутанта  $\beta V319T$  при разном соотношении АТФ/АДФ. Измерения проводились так же, как для мутанта  $\beta F139Y$  на рис. 3

[6, 9, 13, 14], в соответствующем положении находится глутамин. Ранее было показано, что замена  $\beta L249Q$  в  $F_0F_1$  из *E. coli* приводит к усилению АДФ-ингибирования и меняет на противоположный эффект фосфата [17].

Проведенный в данной работе биоинформатический анализ последовательностей субъединиц  $\beta$  прокариотических АТФ-синтаз показал, что тип аминокислотного остатка в положениях, соответствующих  $\beta 139$ ,  $\beta 158$ ,  $\beta 189$ ,  $\beta 249$  и  $\beta 319$   $F_0F_1$  из *E. coli*, различается между ферментами бета- и гамма-протеобактерий (включая *E. coli*) и ферментами из остальных эубактерий, хлоропластов и митохондрий (рис. 1).

Мы предположили, что, как и в случае  $\beta 249$ , тип аминокислотного остатка в этих позициях может влиять на выраженность АДФ-ингибирования и его модуляцию  $\Phi_H$ . Для проверки этой гипотезы были сделаны мутанты *E. coli*, в которых аминокислотный остаток, характерный для

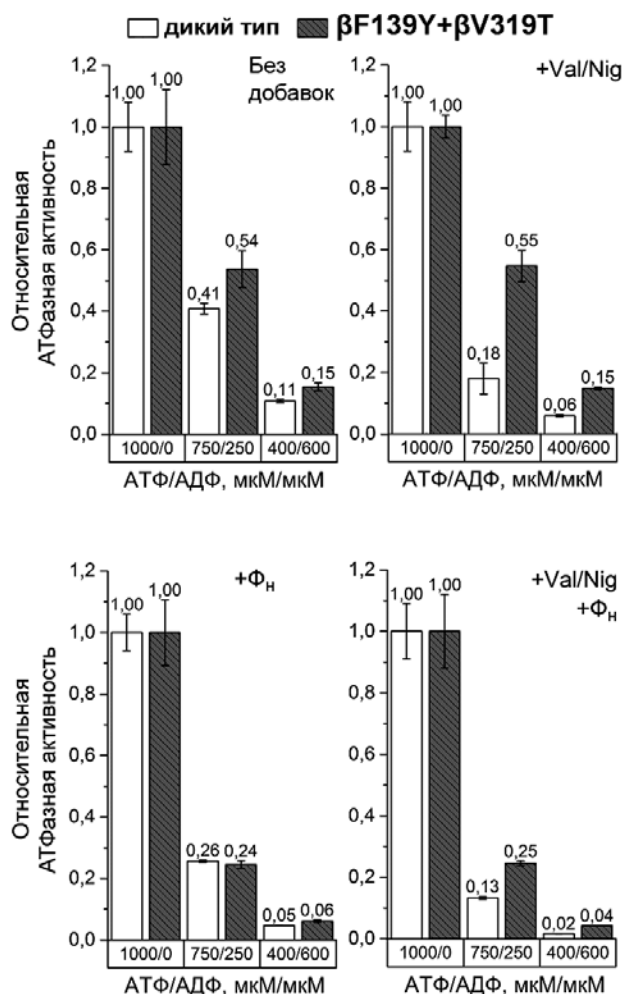


Рис. 6. Относительная АТФазная активность СБЧ дикого типа и мутанта  $\beta F139Y + \beta V319T$  при разном соотношении АТФ/АДФ. Измерения проводились так же, как для мутанта  $\beta F139Y$  на рис. 3

бета- и гамма-протеобактерий, был заменен на остаток, характерный для прочих эубактерий, митохондрий и хлоропластов.

Для остатка  $\beta 158$  эта гипотеза не подтвердилась: во всех опробованных условиях мы не обнаружили достоверных отличий фермента с заменой  $\beta N158L$  от  $F_0F_1$  *E. coli* дикого типа. Остальные мутации также не оказали заметного влияния на АТФазную активность  $F_0F_1$  *E. coli* при гидролизе 1 мМ АТФ в отсутствие добавленного АДФ (рис. 2). Немного меньшая по сравнению с диким типом активность в мутантах  $\beta F139Y$  и  $\beta V319T$  может быть связана как с пониженной экспрессией мутантного белка, так и с небольшим отрицательным влиянием мутаций на активность. Несколько повышенная активность двойного мутанта  $\beta F139Y + \beta V319T$  и отсутствие стимуляции активности при исчезновении протондвижущей силы позволяют

предположить, что СБЧ этого мутанта изначально имели повышенную протонную проводимость, которая уже не могла быть увеличена добавкой разобшителя.

Влияние изучаемых мутаций на АТФазную активность  $F_0F_1$  было обнаружено в условиях, когда в среду добавляли АДФ. Чтобы смоделировать ситуацию, возникающую в клетке в условиях снижения запасов АТФ, когда общая концентрация адениновых нуклеотидов остается постоянной, но падает отношение АТФ/АДФ, мы измерили АТФазную активность СБЧ в двух вариантах смеси АТФ/АДФ (750/250 и 400/600 мкМ). В таких условиях мутация  $\beta F139Y$  снижала ингибирующий эффект АДФ только в отсутствие  $\Phi_H$  (рис. 3). Это дает основание предположить, что тип аминокислотного остатка в этом положении может оказывать влияние на стабильность АДФ-ингибированного состояния фермента, однако не влияет на способность  $\Phi_H$  модулировать вероятность перехода  $F_0F_1$  из актив-

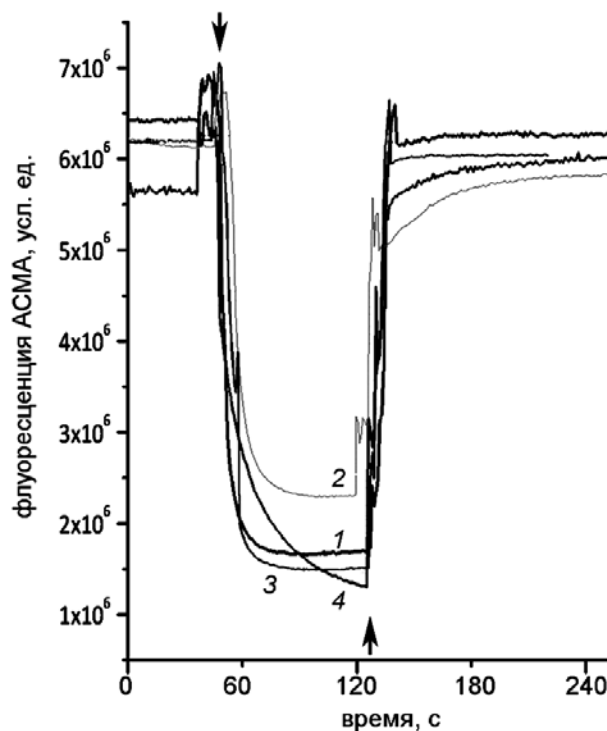


Рис. 7. Изменение флуоресценции зонда АСМА, вызванное АТФ-зависимым протонным транспортом в суббактериальных частицах (СБЧ). Возникновение градиента рН на мембранах СБЧ в ответ на добавление АТФ до концентрации 500 мкМ регистрировалось по гашению флуоресценции индикатора АСМА как описано в разделе «Методы исследования». Стрелками сверху отмечены добавки АТФ, стрелками снизу – добавки разобшителя (смесь валиномицина и нигерицина в концентрациях 500 нМ каждый). 1 – СБЧ дикого типа, 2 – СБЧ из мутанта  $\beta F139Y$ , 3 – СБЧ из мутанта  $\beta F189L$ , 4 – СБЧ из мутанта  $\beta V319T$



ного в АДФ-ингибированное состояние. Мутация  $\beta F189L$ , наоборот, заметно меняла влияние величины отношения АТФ/АДФ на активность в присутствии  $\Phi_H$  (рис. 4). У СБЧ дикого типа в присутствии  $\Phi_H$  подавление АТФазной активности в ответ на снижение отношения АТФ/АДФ было выражено вдвое сильнее, чем у мутантного образца. Примечательно, что схожий эффект наблюдали и без  $\Phi_H$  на разобренных СБЧ. Все перечисленные выше эффекты мутации  $\beta F189L$  еще ярче были выражены на СБЧ из мутанта  $\beta V319T$  (рис. 5). Не исключено, что их пониженная АТФазная активность (рис. 2) связана с общим усилением АДФ-ингибирования. В совокупности эти результаты позволяют предположить, что мутации  $\beta F189L$  и  $\beta V319T$  до некоторой степени препятствуют характерному для  $F_0F_1$  из *E. coli* усилению АДФ-ингибирования  $\Phi_H$ . По всей видимости, аминокислотные остатки в данных положениях влияют на зависящую от протондвижущей силы модуляцию  $\Phi_H$  перехода фермента из активного состояния в АДФ-ингибированное.

Введение мутации  $\beta V319T$ , на фоне замены  $\beta F139Y$ , мало повлияло на активность СБЧ в отсутствие  $\Phi_H$ : картина, наблюдаемая на двойном мутанте, напоминала таковую на каждом из одиночных. Однако в присутствии 3 мМ  $\Phi_H$  эффект замены  $\beta F139Y$  «перевесил»: при пониженном отношении АТФ/АДФ у двойного мутанта не наблюдали характерной для образцов  $\beta V319T$  высокой по сравнению с диким типом активности.

Суммируя полученные нами результаты, можно сказать, что аминокислотный остаток в трех из обнаруженных нами четырех позиций в субъединице  $\beta$ , различающихся по типу консервативной аминокислоты в  $F_0F_1$  бета- и гамма-протеобактерий (включая *E. coli*) и ферментах из остальных эубактерий, хлоропластов и митохондрий, оказывает влияние на АДФ-ингибирование АТФ-синтазы. Не исключено, что низкая

степень выраженности АДФ-ингибирования, свойственная ферменту *E. coli*, определяется именно аминокислотами в положениях  $\beta 249$  и описанными в данной работе  $\beta 139$ ,  $\beta 189$  и  $\beta 319$ , и свойственна АТФ-синтазам бета- и гамма-протеобактерий в целом. Дальнейшее изучение различий в молекулярном механизме АДФ-ингибирования между митохондриальным  $F_0F_1$  и ферментом гамма-протеобактерий, среди которых есть ряд опасных патогенов (рис. 1), представляет не только научный, но и прикладной интерес. Прояснение этого механизма, возможно, позволит найти низкомолекулярные соединения, избирательно влияющие на АДФ-ингибирование и подавляющие активность АТФ-синтазы патогенных гамма-протеобактерий, но не оказывающие заметного влияния на эукариотический фермент. В случае  $H^+$ -транслоцирующего комплекса  $F_0$  такой подход уже увенчался успехом и позволил разработать новый антибиотик, эффективно и избирательно подавляющий АТФ-синтазу микобактерий [27, 28].

### Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект 14-14-00128 «Молекулярные механизмы преобразования энергии при бактериальном окислительном фосфорилировании»).

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Алексею Елисееву за помощь с экспериментами на мутанте  $\beta N158L$ .

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sobti, M., Smits, C., Wong, A.S., Ishmukhametov, R., Stock, D., Sandin, S., and Stewart, A.G. (2016) Cryo-EM structures of the autoinhibited *E. coli* ATP synthase in three rotational states, *Elife*, **5**, e21598.
2. Stewart, A.G., Laming, E.M., Sobti, M., and Stock, D. (2014) Rotary ATPases – dynamic molecular machines, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **25**, 40–48.
3. Watanabe, R. (2013) Rotary catalysis of  $F_0F_1$ -ATP synthase, *Biophysics*, **9**, 51–56.
4. Junge, W., and Nelson, N. (2015) ATP synthase, *Annu. Rev. Biochem.*, **84**, 631–657.
5. Feniouk, B.A., and Yoshida, M. (2008) Regulatory mechanisms of proton-translocating  $F_0F_1$ -ATP synthase, *Results Probl. Cell Differ.*, **45**, 279–308.
6. Carmeli, C., and Lifshitz, Y. (1972) Effects of  $P_i$  and ADP on ATPase activity in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 86–95.
7. Minkov, I.B., Fitin, A.F., Vasilyeva, E.A., and Vinogradov, A.D. (1979)  $Mg^{2+}$ -induced ADP-dependent inhibition of the ATPase activity of beef heart mitochondrial coupling factor  $F_1$ , *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1300–1306.
8. Yoshida, M., and Allison, W.S. (1983) Modulation by ADP and  $Mg^{2+}$  of the inactivation of the  $F_1$ -ATPase from the thermophilic bacterium, PS3, with dicyclohexylcarbodiimide, *J. Biol. Chem.*, **258**, 14407–14412.
9. Turina, P., Rumberg, B., Melandri, B.A., and Graber, P. (1992) Activation of the  $H^+$ -ATP synthase in the photosyn-

- thetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *J. Biol. Chem.*, **267**, 11057–11063.
10. Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (2004) Energy-dependent transformation of  $F_0F_1$ -ATPase in *Paracoccus denitrificans* plasma membranes, *J. Biol. Chem.*, **279**, 12319–12324.
  11. Fischer, S., Graber, P., and Turina, P. (2000) The activity of the ATP synthase from *Escherichia coli* is regulated by the transmembrane proton motive force, *J. Biol. Chem.*, **275**, 30157–30162.
  12. Lapashina, A.S., and Feniouk, B.A. (2018) ADP-inhibition of  $H^+$ - $F_0F_1$ -ATP synthase, *Biochemistry (Moscow)*, **10**, 1141–1160.
  13. Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (2006) Energy-linked binding of  $P_i$  is required for continuous steady-state proton-translocating ATP hydrolysis catalyzed by  $F_0F_1$  ATP synthase, *Biochemistry*, **45**, 14552–14558.
  14. Feniouk, B.A., Suzuki, T., and Yoshida, M. (2007) Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit  $\epsilon$  in bacterial ATP synthase, *J. Biol. Chem.*, **282**, 764–772.
  15. D'Alessandro, M., Turina, P., and Melandri, B.A. (2008) Intrinsic uncoupling in the ATP synthase of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1518–1527.
  16. Feniouk, B.A., Wakabayashi, C., Suzuki, T., and Yoshida, M. (2012) A point mutation, betaGln259Leu, relieves MgADP inhibition in Bacillus PS3 ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, S13.
  17. Prikhodko, A., Lapashina, A., Zinovkin, R., Vitushkina, M., and Feniouk, B. (2012) The effect of mutations  $\gamma$ M23K and  $\beta$ L249Q on ADP-inhibition of  $H^+$ - $F_0F_1$ -ATP-synthase in *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, S22.
  18. Galperin, M.Y., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2015) Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D261–D269.
  19. Dibrova, D.V., Kononov, K.A., Perekhvatov, V.V., Skulachev, K.V., and Mulikidjanian, A.Y. (2017) COGcollator: a web server for analysis of distant relationships between homologous protein families, *Biol. Direct.*, **12**, 29.
  20. Finn, R.D., Clements, J., and Eddy, S.R. (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching, *Nucleic Acids Res.*, **39**, W29–W37.
  21. Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792–1797.
  22. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009) Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench, *Bioinformatics*, **25**, 1189–1191.
  23. Ishmukhametov, R.R., Galkin, M.A., and Vik, S.B. (2005) Ultrafast purification and reconstitution of His-tagged cysteine-less *Escherichia coli*  $F_1F_0$  ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1706**, 110–116.
  24. Nishimura, M., Ito, T., and Chance, B. (1962) Studies on bacterial photophosphorylation. III. A sensitive and rapid method of determination of photophosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 177–182.
  25. Casadio, R., and Melandri, B.A. (1985) Calibration of the response of 9-amino acridine fluorescence to transmembrane pH differences in bacterial chromatophores, *Arch. Biochem. Biophys.*, **238**, 219–228.
  26. Dibrova, D.V., Galperin, M.Y., and Mulikidjanian, A.Y. (2010) Characterization of the N-ATPase, a distinct, laterally transferred  $Na^+$ -translocating form of the bacterial F-type membrane ATPase, *Bioinformatics*, **26**, 1473–1476.
  27. Hards, K., Robson, J.R., Berney, M., Shaw, L., Bald, D., Koul, A., Andries, K., and Cook, G.M. (2015) Bactericidal mode of action of bedaquiline, *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 2028–2037.
  28. Koul, A., Dendouga, N., Vergauwen, K., Molenberghs, B., Vranckx, L., Willebrords, R., Ristic, Z., Lill, H., Dorange, I., Guillemont, J., Bald, D., and Andries, K. (2007) Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 323–324.

## AMINO ACID RESIDUES $\beta$ 139, $\beta$ 189, AND $\beta$ 319 MODULATE ADP-INHIBITION IN *Escherichia coli* $H^+$ - $F_0F_1$ -ATP SYNTHASE

A. S. Lapashina<sup>1,2</sup>, T. E. Shugaeva<sup>1</sup>, K. M. Berezina<sup>1</sup>, T. D. Kholina<sup>1</sup>, and B. A. Feniouk<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: feniouk@fbb.msu.ru

Received October 9, 2018

Revised November 6, 2018

Accepted November 6, 2018

Proton-translocating  $F_0F_1$ -ATP synthase (F-type ATPase, F-ATPase or  $F_0F_1$ ) performs ATP synthesis/hydrolysis coupled to proton transport across the membrane in mitochondria, chloroplasts, and most eubacteria. The ATPase activity of the enzyme is suppressed in the absence of protonmotive force by several regulatory mechanisms. The most conserved of these mechanisms is noncompetitive inhibition of ATP hydrolysis by the MgADP complex (ADP-inhibition) which has been found in all the enzymes studied. When MgADP binds without phosphate in the catalytic site, the enzyme goes into inactive state, and MgADP is locked in the catalytic site and does not exchange with the medium. The degree of ADP-inhibition varies in  $F_0F_1$  enzymes from different organisms. In the *Escherichia coli* enzyme, ADP-inhibition is relatively weak and, in contrast to other organisms, is enhanced rather than suppressed by phosphate. In this study, we used site-directed mutagenesis to investigate the role of amino acid residues  $\beta$ 139,  $\beta$ 158,  $\beta$ 189, and  $\beta$ 319 of *E. coli*  $F_0F_1$ -ATP synthase in the mechanism of ADP-inhibition and its modulation by the protonmotive force. These amino acid residues differ in the enzymes from beta- and gammaproteobacteria (including *E. coli*) and  $F_0F_1$ -ATP synthases from other eubacteria, mitochondria, and chloroplasts. The  $\beta$ N158L substitution produced no effect on the enzyme activity, while substitutions  $\beta$ F139Y,  $\beta$ F189L, and  $\beta$ V319T only slightly affected ATP (1 mM) hydrolysis. However, in a mixture of ATP and ADP, the activity of the mutants was less suppressed than that of the wild-type enzyme. In addition, mutations  $\beta$ F189L and  $\beta$ V319T weakened the ATPase activity inhibition by phosphate in the presence of ADP. We suggest that residues  $\beta$ 139,  $\beta$ 189, and  $\beta$ 319 are involved in the mechanism of ADP-inhibition and its modulation by phosphate.

**Keywords:** ATP synthase, F-ATPase, ADP-inhibition, regulation, *Escherichia coli*, bioenergetics,  $F_0F_1$