

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ $F_0 \cdot F_1$ -АТРаза/АТР-СИНТАЗЫ *Paracoccus denitrificans* И ВЕНТУРИЦИДИНА В УСЛОВИЯХ ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

© 2022 Т. В. Жарова^{1*}, В. С. Козловский², В. Г. Гривенникова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биохимии,
119234 Москва, Россия; электронная почта: tzharova2018@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.04.2022

После доработки 18.05.2022

Принята к публикации 20.05.2022

Протонтранслоцирующая $F_0 \cdot F_1$ -АТРаза/синтаза катализирует синтез и гидролиз АТР, и ее принято рассматривать как обратимо функционирующий комплекс. Ранее мы показали, что вентурицидин, специфический F_0 -направленный ингибитор, блокирует синтез и гидролиз АТР со значительным различием в средстве (Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2017) *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 939–944). В настоящей работе мы детально исследовали торможение вентурицидином $F_0 \cdot F_1$ -АТРаза/синтазы в составе прочносопряженных мембран *Paracoccus denitrificans* в условиях генерации мембранного потенциала. Гидролиз АТР регистрировали в реакции, сопряженной с потенциал-зависимым восстановлением NAD^+ убихинолом (обратный перенос электронов), катализируемым комплексом I дыхательной цепи. Продемонстрировано, что энергизация мембраны не влияет на средство $F_0 \cdot F_1$ -АТРаза/синтазы к вентурицидину. Зависимость остаточной АТР-синтазной активности от концентрации ингибитора приближается к линейной функции, тогда как при гидролизе АТР эта зависимость была сигмоидальной: в области низких концентраций ингибитора значительное торможение синтеза АТР вентурицидином не сопровождается падением скорости гидролиза. Предложена модель, рассматривающая две разные формы $F_0 \cdot F_1$, одна из которых катализирует синтез, а вторая – гидролиз АТР.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: $F_0 \cdot F_1$ -АТРаза/синтаза, *Paracoccus denitrificans*, вентурицидин.

DOI: 10.31857/S0320972522080073, **EDN:** AYKGKX

ВВЕДЕНИЕ

$F_0 \cdot F_1$ -АТРаза/синтаза (ЕС 7.1.2.2) энергопреобразующих мембран сопрягает синтез или гидролиз АТР с трансмембранным транспортом протонов. F_0 – это мембранная часть комплекса, построенная из 8–17 гидрофобных *c*-субъединиц, образующих кольцо, и примыкающих к нему субъединиц ab_2 , которая осуществляет перенос протонов. F_1 представляет собой гидрофильную часть ферментного комплекса,

катализирующую синтез или гидролиз АТР. Бактериальный F_1 построен из пяти различных белков со стехиометрией $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (номенклатура, предложенная для фермента *E. coli*). Чередующиеся $\alpha\beta$ -димеры формируют гексамер, на котором расположены нуклеотид-связывающие центры. F_0 и F_1 связаны между собой статором δ/b_2 , соединенным с *a*-субъединицей. Субъединицы $\gamma\epsilon$ контактируют, с одной стороны, с F_1 внутри центральной полости гексамера, а с другой стороны – с *c*-кольцом, вместе с которым $\gamma\epsilon$ вращаются относительно статора δ/b_2 [1–6].

Широко принято, что $F_0 \cdot F_1$ – обратимо функционирующий комплекс, катализирующий либо гидролиз АТР, сопряженный с векторным переносом протонов через мембрану, либо синтез АТР, использующий свободную энергию такого переноса в обратной реакции.

Принятые сокращения: СБЧ – суббактериальные частицы *Paracoccus denitrificans*; СССР – карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон; *pmf* – протондвижущая сила (от *англ.* proton motive force); F_1 – гидрофильная часть АТР-синтазы; F_0 – мембранная часть АТР-синтазы; S-13 – 5-хлор-3-трет-бутил-2'-хлор-4-нитросалициланид; $\Delta\Psi$ – трансмембранный электрический потенциал.

* Адресат для корреспонденции.

При этом направление процесса определяется вращением γ -субъединицы либо против часовой стрелки – при гидролизе, либо по часовой стрелке – при синтезе АТР (если смотреть со стороны F_o) [7–9]. Тем не менее ряд фактов не согласуется с представлениями о простой обратимости $F_o \cdot F_1$ -АТРазы [10]. Если синтез/гидролиз АТР происходит по единому каталитическому механизму, то ингибиторы и активаторы прямой реакции должны оказывать одинаковый эффект и на обратную реакцию. Между тем в литературе известны так называемые «односторонние» ингибиторы фермента (белковый ингибитор IF_1 [11, 12], антибиотик ауровертин [13, 14], азид [15, 16] и ряд других веществ [17]), избирательно влияющие на протекание реакции только в одном направлении. Разная чувствительность синтеза и гидролиза АТР к некоторым ингибиторам и активаторам привела к появлению моделей механизма окислительного фосфорилирования, основанных на различиях в каталитических путях прямой и обратной реакции [18, 19]. Руководитель нашей группы проф. А.Д. Виноградов выдвинул гипотезу о том, что процессы синтеза и гидролиза АТР катализируются двумя разными формами $F_o \cdot F_1$ – синтазной и гидролазной [20, 21].

Большинство данных, приведших к представлению об обратимости $F_o \cdot F_1$, было получено при изучении АТР-гидролазной активности водорастворимого фрагмента (F_1) или $F_o \cdot F_1$ в составе несопряженных мембран, не способных катализировать энергозависимый синтез АТР. Для доказательства предложенной гипотезы был необходим препарат $F_o \cdot F_1$, эффективно катализирующий не только гидролиз АТР, но и окислительное фосфорилирование. В качестве такого объекта исследования нами были выбраны прочносопряженные суббактериальные частицы почвенной бактерии *Paracoccus denitrificans* (СБЧ), плазматическая мембрана которой по многим свойствам очень похожа на внутреннюю мембрану митохондрий млекопитающих [22]. $F_o \cdot F_1$ *P. denitrificans* демонстрирует исключительно высокую скорость синтеза АТР, равную 1–2 мкмоль/мин на мг белка [23], а его очень низкую природную АТРазную активность (~ 0,1 мкмоль/мин на мг белка [23]) можно многократно активировать сульфитом [24] или энергизацией мембран [25]. Такой препарат дает возможность проследить как гидролиз, так и энергозависимый синтез АТР [26, 27].

Вентурицидин – специфический ингибитор окислительного фосфорилирования в митохондриях, хлоропластах и бактериях – взаимодействует с c -субъединицей F_o -домена мембраносвязанной АТРазы и блокирует пере-

нос протонов [28]. В ранних работах было обнаружено сильное различие в чувствительности к вентурицидину окислительного фосфорилирования и реакции гидролиза АТР, катализируемых $F_o \cdot F_1$ *P. denitrificans*, которое авторы объясняли тем, что энергизация частиц, возможно, увеличивает сродство фермента к вентурицидину [23]. Однако позднее было показано, что, напротив, чувствительность АТРазы *P. denitrificans* к ингибитору ниже в энергизованных мембранах, а ингибитор предпочтительно связывается с неактивными или разобщенными молекулами фермента [24]. Мы подтвердили, что катализируемое $F_o \cdot F_1$ *P. denitrificans* окислительное фосфорилирование более чувствительно к вентурицидину по сравнению с гидролазной реакцией [29], и рассматривали это как указание на различающиеся механизмы синтеза и гидролиза АТР. При этом нельзя было исключить и альтернативное объяснение этих результатов, согласно которому энергизация/деэнергизация мембраны могут влиять на кинетику взаимодействия фермента и ингибитора [23, 30], тем более, что условия измерения реакции в двух направлениях заметно отличались: эффективное окислительное фосфорилирование требует энергизации сопрягающей мембраны (создание на мембране протондвижущей силы, *pmf*), тогда как гидролиз АТР регистрируют в присутствии разобщителей. В настоящей работе мы провели ингибиторный анализ синтеза и гидролиза АТР $F_o \cdot F_1$ *P. denitrificans* в условиях постоянной генерации *pmf* на мембране. Гидролиз АТР регистрировали в реакции АТР-зависимого обратного переноса электронов на NAD^+ , катализируемого комплексом I дыхательной цепи, протекающего только в энергизованных мембранах [31]. Мы показали значительные различия во взаимодействии вентурицидина с $F_o \cdot F_1$: приближающееся к линейному титрование и сигмоидальную зависимость для прямой и обратной реакции соответственно. Полученные результаты обсуждаются в рамках модели, согласно которой синтез и гидролиз АТР катализируют две разные формы $F_o \cdot F_1$ [20, 21].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Использовались ADP, АТР, NAD (натриевые соли), НЕРЕС, сукцинат, $MgCl_2$, ЭДТА, сахароза, СССР и феноловый красный производства «Sigma» (США), вентурицидин В – «A.G. Scientific Inc.» (США), оксонол VI – «Molecular probes» (США), остальные реактивы – отечественного производства квалификации х.ч. и о.с.ч.

Препарат плазматических мембран *P. denitrificans*. Клетки *P. denitrificans* (штамм Pd 1222) растили анаэробно в присутствии сукцината и нитрата [32]. Препарат прочносопряженных плазматических мембран получали по модифицированному методу Джона и Уатли [32, 33]. Полученные СБЧ суспендировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 10 мМ Tris-ацетат (рН 7,3), 0,1 М малонат и 1 мМ MgCl₂ (концентрация белка ~ 20 мг/мл) и хранили в жидком азоте. Содержание белка в препаратах определяли по биуретовой реакции.

Обработка вентурицидином. СБЧ разводили в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 2,5 мМ НЕРЕС (рН 8,0), 5,0 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ ЭДТА до концентраций, указанных в подписях к рисункам, и инкубировали с вентурицидином в течение 60 мин при комнатной температуре.

Синтез и гидролиз АТФ. Скорости синтеза и гидролиза АТФ измеряли путем непрерывной регистрации изменения концентрации ионов водорода с помощью стеклянного электрода или по изменению поглощения рН-индикатора фенолового красного при 557/620 нм [34]. Где указано, гидролиз АТФ регистрировали с использованием АТФ-регенерирующей системы (1,5 мМ фосфоенолпируват, 0,15 мМ NADH, 2,5 ед./мл пируваткиназы, 5 ед./мл лактатдегидрогеназы) по уменьшению поглощения NADH при 340 нм.

Обратный перенос электронов. СБЧ (0,1 мг/мл) инкубировали 1 мин в стандартной среде, реакцию начинали добавлением 1 мМ NAD⁺ (аэробный обратный перенос) или одновременным внесением 1 мМ NAD⁺, 0,5 мМ KCN и 0,5 мМ АТФ (АТФ-зависимый обратный перенос). Начальные скорости восстановления NAD⁺ определяли спектрофотометрически при 340 нм.

Мембранный потенциал регистрировали по изменению ответа 1,5 мкМ оксонола VI при 624/602 нм [35].

Стандартная среда измерения содержала 0,25 М сахарозу, 2,5 мМ НЕРЕС (рН 8,0), 5,0 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ЭДТА, 2,5 мМ сукцинат и 1 мМ фосфат калия. Прочие добавки указаны в подписях к рисункам и таблице. Все опыты проводили при 30 °С.

Каталитические активности измеряли не менее, чем в трех повторях. Различия экспериментальных значений находились в пределах 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке 1 представлены результаты эксперимента, в котором синтез и гидролиз АТФ регистрировали в одной пробе. Сопряженные СБЧ катализировали синтез АТФ практически по нулевому порядку вплоть до очень низких остаточных концентраций ADP. Если после за-

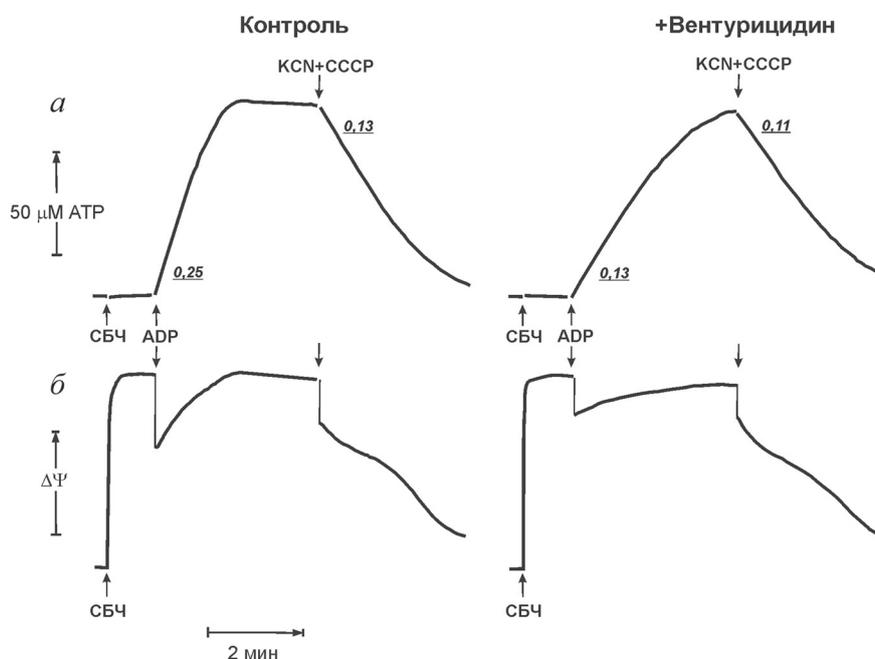


Рис. 1. Влияние вентурицидина на синтез и гидролиз АТФ (а) и изменение мембранного потенциала (б) в СБЧ *P. denitrificans*. а – СБЧ инкубировали с вентурицидином (0,28 нмоль/мг белка), как описано в разделе «Методы исследования». Аликвоты контрольных (слева) и обработанных вентурицидином СБЧ (справа) вносили в стандартную среду и через 1 мин синтез АТФ инициировали добавлением 100 мкМ ADP. Реакцию обрашали внесением 1 мМ KCN и 1 мкМ СССР. Цифрами у кривых обозначены скорости синтеза/гидролиза АТФ в мкмоль/мин на 1 мг белка СБЧ. Концентрация белка СБЧ в среде измерения составляла 0,24 мг/мл. б – Регистрация мембранного потенциала по ответу оксонола VI в тех же условиях

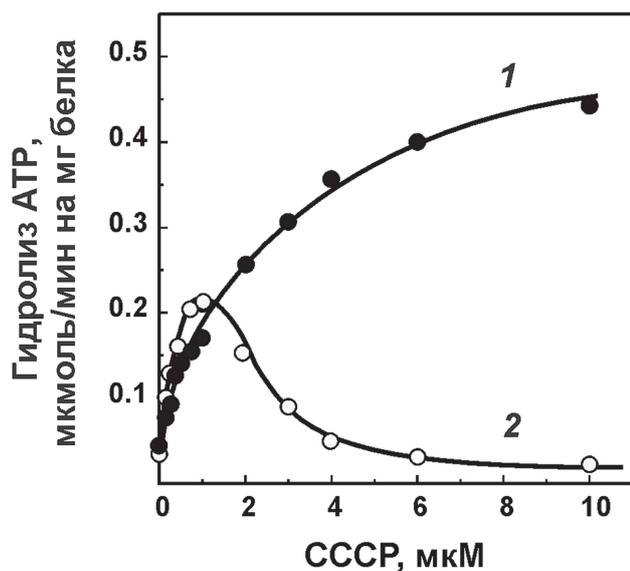


Рис. 2. Влияние вентурицидина на зависимость скорости гидролиза АТР от концентрации разобшителя. СБЧ (0,06 мг/мл), контрольные (кривая 1) и обработанные вентурицидином (0,71 нмоль/мг, кривая 2), инкубировали 1 мин в стандартной среде, реакцию начинали одновременным добавлением 1 мМ KCN, 1 мМ АТР и СССР в указанных концентрациях

вершения фосфорилирования блокировали дыхание добавлением KCN, то после внесения разобшителя (СССР), устраняющего давление *pmf*, началась обратная реакция – гидролиз синтезированного АТР. Если СБЧ предварительно инкубировали с вентурицидином (0,28 нмоль/мг белка СБЧ), начальная скорость синтеза АТР падала вдвое, а скорость обратной реакции не изменялась (рис. 1, а). На рис. 1, б в той же временной шкале, что и на рис. 1, а, представлена регистрация мембранного потенциала СБЧ в стандартной среде, содержащей субстрат дыхания сукцинат. В момент добавления ADP (начало синтеза АТР) происходило снижение потенциала, глубина падения которого была меньше в частицах, обработанных вентурицидином, по сравнению с контролем, что отражало ингибирование реакции синтеза. Внесение KCN и разобшителя вызывало медленное снижение $\Delta\Psi$, генерируемого в результате гидролиза АТР как контрольными частицами, так и преинкубированными с вентурицидином (рис. 1, б). Таким образом, заторможенный на 50% в прямой реакции $F_0:F_1$ был практически полностью активен в обратной реакции. Наблюдаемое различие нельзя объяснить разным сродством F_0 к ингибитору из-за изменения энергизации мембраны, поскольку, как видно на рис. 1, величина мембранного потенциала при измерении начальных скоростей синтеза и гидролиза в этом опыте была сравнимой. Снижение чувствительности АТРАЗНОЙ реакции к ингибитору также нельзя

объяснить длительной инкубацией СБЧ, т.к. известно, что в условиях эксперимента вентурицидин практически не диссоциирует из комплекса $F_0:F_1$ с ингибитором [29, 36].

Гидролиз АТР сложным образом зависит от концентрации разобшителя, поскольку потенциал необходим не только для активации АТРАЗЫ *P. denitrificans*, но и для поддержания фермента в активном состоянии [26]. Ранее мы показали, что скорость гидролиза АТР колоколообразно зависит от концентрации разобшителя: в умеренных концентрациях разобшитель снижает *pmf* только частично, что позволяет не только стимулировать гидролиз, но и поддерживать $F_0:F_1$ в активном состоянии, тогда как полное разобшение приводит к резкому торможению гидролиза АТР [26]. Таким образом, величина мембранного потенциала, необходимая для поддержания стационарного гидролиза АТР, определяется двумя параметрами: сопряженностью мембраны и активностью самой АТРАЗЫ. Мы оценили влияние вентурицидина на зависимость начальной скорости гидролиза АТР от концентрации разобшителя. Как видно на рис. 2, в выбранном нами диапазоне (0–10 мкМ) скорость гидролиза АТР гиперболически росла с повышением концентрации разобшителя (кривая 1). В частицах, обработанных вентурицидином, эта зависимость имела колоколообразный характер (кривая 2). Если концентрация СССР превышала 1 мкМ, остаточной гидролитической активности было недостаточно для генерации потенциала, необходимого для поддержания фермента в активном состоянии. Из результатов, приведенных на рис. 2, следует, что для измерения АТРАЗНОЙ активности обработанных вентурицидином СБЧ для каждого соотношения вентурицидин : фермент требуется предварительное аккуратное определение концентрации разобшителя.

На рис. 3 показана зависимость остаточной активности синтеза и гидролиза АТР от концентрации вентурицидина. СБЧ предварительно инкубировали с вентурицидином, и их каталитические активности анализировали по начальным скоростям, предварительно определив для каждого соотношения вентурицидин : фермент необходимую концентрацию разобшителя. Видно, что реакция синтеза АТР (рис. 3, а) более чувствительна к действию вентурицидина по сравнению с реакцией гидролиза (рис. 3, б). Концентрация вентурицидина, вызывающая полумаксимальное торможение активности ($[I]_{50}$), зависела от концентрации СБЧ в среде инкубации (рис. 3, а и б). Такое поведение формально характерно для многих специфических псевдоневобратимых ин-

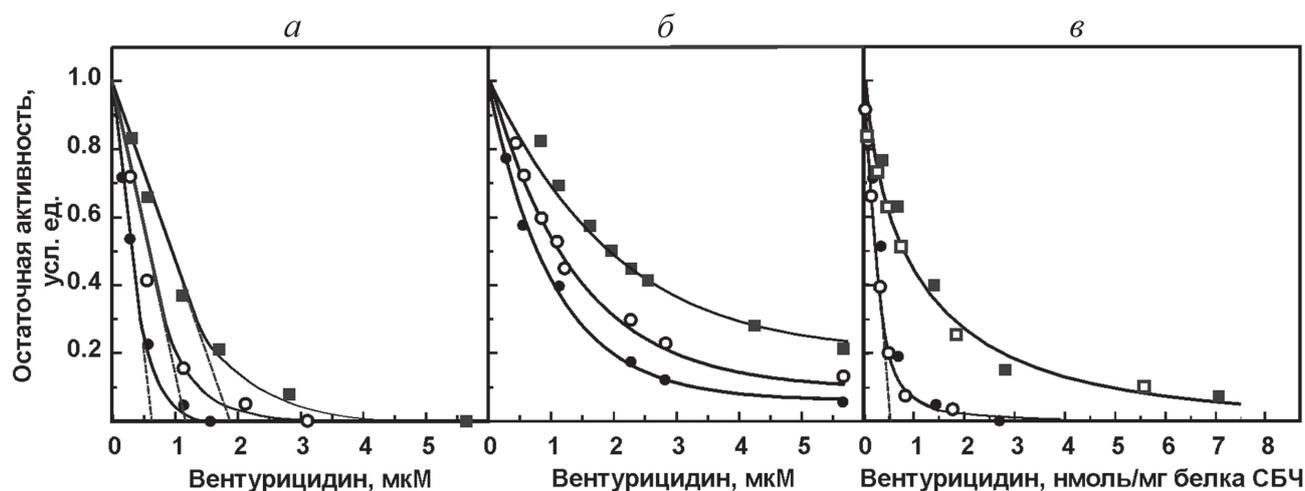


Рис. 3. Зависимость остаточной активности синтеза и гидролиза АТФ от концентрации вентурицидина при разных концентрациях СБЧ. СБЧ предварительно разводили в среде, состоявшей из 0,25 М сахарозы, 2,5 мМ НЕРЕС, 0,1 мМ EDTA, 5,5 мМ MgCl₂ (рН 8,0), до 1,6 мг/мл (●), 2,4 мг/мл (○) и 3,2 мг/мл (■), инкубировали с вентурицидином (концентрации указаны на оси абсцисс), как описано в разделе «Материалы исследования». Для измерения начальных скоростей синтеза (а) и гидролиза АТФ (б) аликвоту СБЧ, обработанных вентурицидином, вносили в 2 мл стандартной среды измерения, и через 1 мин инициировали синтез АТФ внесением 200 мкМ АДФ, а гидролиз АТФ – внесением 1 мМ АТФ, 1 мМ KCN, 1–2 мкМ СССР (подбирали для каждой точки). в – Зависимость остаточной активности от соотношения вентурицин : белок СБЧ. Частицы в концентрации 0,8 мг/мл (●; ■) и 3,8 мг/мл (○; □) инкубировали с вентурицидином и измеряли начальные скорости реакций синтеза (●; ○) и гидролиза АТФ (■; □)

гибиторов, обладающих высоким сродством к ферменту, когда ингибитор и фермент взаимодействуют при сопоставимых концентрациях, соизмеримых с величиной равновесной константы ингибирования K_i [37] (описание такого взаимодействия см. в Приложении, раздел I).

Для реакции синтеза АТФ вплоть до 80%-ного торможения титрование приближалось к линейной зависимости (рис. 3, а), что указывало на то, что величина K_i , по-видимому, значительно ниже концентрации фермента в мембране СБЧ ($K_i \ll [E]_0$). Экстраполяция прямой на ось абсцисс дало величину 0,55 нмоль/мг белка, что согласуется с определенным ранее титром вентурицидина для окислительного фосфорилирования *P. denitrificans* [23]. В реакции гидролиза АТФ титрование было нелинейно во всем диапазоне концентраций вентурицидина (рис. 3, б). По-видимому, обратимое уравнивание фермента и ингибитора, приводящее к торможению АТФазной реакции, происходило в условиях, когда $K_i \geq [E]_0$.

При повышении концентрации СБЧ в среде инкубации можно было ожидать «линеаризацию» кривых титрования АТФазной активности, однако характер зависимостей не менялся, а полумаксимальное торможение достигалось при постоянном соотношении ингибитор : белок как для прямой, так и для обратной реакции (рис. 3, в), которое для реакции гидролиза было в 2,5 раза выше, чем для АТФ-синтазной активности СБЧ. Ранее подобную картину мы наблюдали при титровании NADH-оксидаз-

ной активности дыхательной цепи *P. denitrificans* пиерицидином, специфическим ингибитором комплекса I [38]. Полученный результат может быть связан с тем, что коэффициент распределения вентурицидина между неполярными растворителями и водой составляет 10^5 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10055855#section=Chemical-and-Physical-Properties>). Поэтому добавленный вентурицин из водного раствора практически количественно должен уходить в мембрану СБЧ. При увеличении концентрации частиц в среде инкубации пропорционально увеличивается объем липидной фазы мембраны, но концентрация фермента в мембране при этом остается неизменной. Поэтому одинаковый ингибирующий эффект может быть достигнут при добавлении пропорционально увеличенных количеств вентурицидина.

Можно предположить, что значительное различие в эффектах вентурицидина в реакции синтеза и гидролиза АТФ связано с различными условиями регистрации: мембраны полностью сопряжены в первом и значительно разобщены во втором случае. Так как измерение скорости гидролиза АТФ требует подбора концентрации разобщителя для каждой концентрации вентурицидина (рис. 2), в каждой точке кривой титрования концентрации разобщителя различаются, а, следовательно, меняется степень сопряженности СБЧ. Чтобы выяснить, влияет ли потенциал на сродство F₀F₁ *P. denitrificans* к вентурицидину, мы решили определять АТФазную активность мембран *P. denitrificans* в систе-

ме, сопряженной с АТФ-зависимым обратным переносом электронов на NAD^+ , катализируемым комплексом I дыхательной цепи СБЧ. Сопряжение обратного переноса с гидролизом АТФ позволяет измерять активность АТФазы при полном отсутствии разобщителя.

Суббактериальные частицы *P. denitrificans* характеризуются высоким дыхательным контролем и идеально подходят для изучения процессов, требующих поддержания высокого потенциала на мембране. В литературе описан процесс восстановления NAD^+ *P. denitrificans*, поддерживаемый *pmf*, возникающей в результате аэробного окисления сукцината (так называемый аэробный обратный перенос электронов) [39]. Тем не менее мы не нашли информации об обратном переносе электронов в СБЧ *P. denitrificans*, протекающем за счет энергии гидролиза АТФ. Поэтому мы исследовали реакцию АТФ-зависимого обратного переноса электронов в мембранах *P. denitrificans*. Кинетические характеристики этой реакции даны в таблице. Для сравнения приведены данные литературы об обратном переносе электронов, катализируемом хорошо изученным препаратом, субмитохондриальными частицами сердца быка (СМЧ). Скорости восстановления NAD^+ сукцинатом в аэробных условиях близки для СМЧ и для мембран *P. denitrificans*. Константа Михаэлиса для NAD^+ (K^{NAD}_m) в аэробном обратном переносе, по данным разных авторов, варьирует от 20 мкМ [39] до 270 мкМ [38]. Скорость АТФ-зависимого обратного переноса *P. denitrificans* сравнима с активностью процесса в СМЧ [31], тогда как величина константы Михаэлиса для NAD^+ заметно выше. Ранее мы показали, что $K^{\text{АТФ}}_m$, определенная для стимулированного разобщителем гидролиза АТФ, составляет около 100 мкМ и повышается при увеличении степени разобщения частиц [42]. Как видно в таблице, $K^{\text{АТФ}}_m$ в АТФ-зависимом восстановлении NAD^+ сукцинатом значительно ниже этой величины, что, возможно, отражает разницу во взаимодействии субстрата с ферментом в сопряженных и

частично разобщенных частицах. АТФ-зависимый обратный перенос электронов в мембранах *P. denitrificans* полностью подавлялся разобщителем, а также избытком пирицидина и вентурицидина, специфических ингибиторов бактериального комплекса I и F_0F_1 -АТФазы соответственно. Мы обнаружили, что АТФ-зависимый обратный перенос *P. denitrificans* требует предварительной энергизации частиц, что полностью согласуется с данными литературы об исходной очень низкой АТФазной активности *P. denitrificans* [24], которая, по нашим данным, активируется потенциалом [25].

Ранее мы продемонстрировали значительную разницу в рН-профиле прямой и обратной реакций, катализируемых F_0F_1 : снижение рН в диапазоне 6,5–8,0 приводило к обратимому ингибированию гидролитической активности, тогда как активность синтеза АТФ практически не изменялась [29]. Как показано на рис. 4, закисление среды измерения не влияло на активность аэробного восстановления NAD^+ , но приводило к резкому снижению скорости восстановления NAD^+ , поддерживаемого гидролизом АТФ. Видно, что рН-зависимости АТФ-зависимого восстановления NAD^+ и гидролиза АТФ хорошо совпадают.

Таким образом, измеряя АТФ-зависимое восстановление NAD^+ , мы получили возможность регистрировать гидролиз АТФ в *P. denitrificans* и изучать взаимодействие F_0F_1 -АТФазы с вентурицидином в энергизованных мембранах.

Используя предложенный подход, мы провели титрование и получили зависимость остаточной активности гидролиза АТФ от концентрации вентурицидина (рис. 5), аналогичную той, которая представлена на рис. 3. Как видно на рис. 5, общий характер падения остаточной активности при увеличении концентрации вентурицидина как для окислительного фосфорилирования (почти линейная зависимость до 30% остаточной активности), так и для гидролиза АТФ не изменился. Таким образом, различия чувствительности к ингибитору

Кинетические характеристики обратного переноса электронов в СМЧ сердца быка и в СБЧ *P. denitrificans*

	Аэробный обратный перенос электронов			АТФ-зависимый обратный перенос электронов		
	K^{NAD}_m , мкМ	$K^{\text{АТФ}}_i$, мкМ	активность, мкмоль/мин на мг белка	K^{NAD}_m , мкМ	$K^{\text{АТФ}}_m$, мкМ	активность, мкмоль/мин на мг белка
СМЧ	37,0 [31]	–	0,10–0,25 [31, 40, 41]	7 [31]	–	0,21–0,25 [31, 41]
СБЧ	35 ± 4	700 ± 50	0,13 ± 0,03	100 ± 10	22 ± 2	0,09 ± 0,02

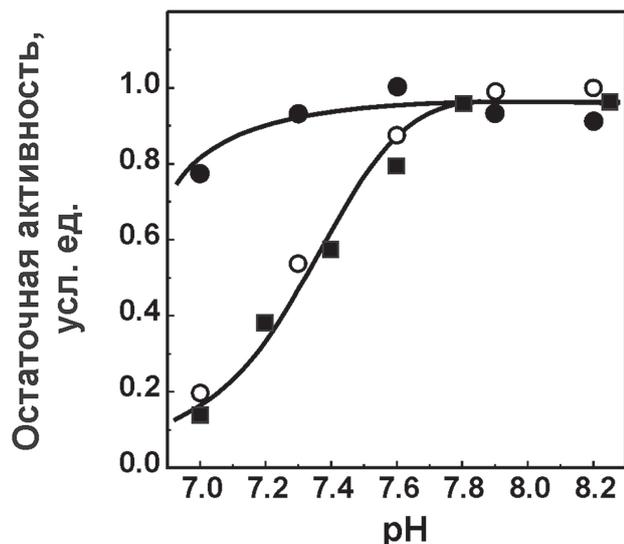


Рис. 4. pH-зависимость аэробного и АТФ-зависимого обратного переноса электронов и гидролиза АТФ в СБЧ *P. denitrificans*. СБЧ (0,06 мг) добавляли в стандартную среду, pH которой изменяли до значений, указанных на графике. Через 1 мин вносили 1 мМ NAD⁺ (●, аэробный обратный перенос) или 1 мМ NAD⁺, 1 мМ KCN и 1 мМ АТФ (○, АТФ-зависимый обратный перенос) и регистрировали восстановление NAD⁺ при 340 нм. Поглощение, обусловленное взаимодействием NAD⁺ и KCN, определяли для каждого значения pH и вычитали. Гидролиз АТФ измеряли с помощью АТФ-регенерирующей системы, реакцию начинали внесением 1 мМ KCN, 1–3 нМ разбавителя S-13 (подбирали для каждой точки) и 1 мМ АТФ (■)

прямой и обратной реакций, катализируемых комплексом F_o:F₁, обнаруженные ранее [29] и подтвержденные в настоящей работе, не связаны с условиями регистрации этих активностей. Полученные данные подтверждают высказанное нами ранее предположение об участии двух независимых форм F_o:F₁ в реакциях синтеза и гидролиза АТФ.

В области относительно низких концентраций вентурицидина, которые в значительной степени ингибировали синтез АТФ, на графике для гидролазной реакции мы обнаружили отчетливо выраженную сигмоидальность, которую можно объяснить в рамках модели связывания ингибитора с двумя независимыми формами комплекса F_o:F₁. Более подробно эту модель мы рассмотрели в Приложении (раздел II). Зависимость остаточной активности (синтазной или гидролазной) смеси двух ферментов (E₁ и E₂), обладающих разным сродством (K₁ и K₂) к лиганду (I), описывается сложным уравнением с четырьмя параметрами [E₁]₀, [E₂]₀, K₁ и K₂, подбирая значения которых можно добиться наилучшего совпадения расчетных кривых с экспериментально полученными кривыми титрования (рис. 5). В качестве критерия

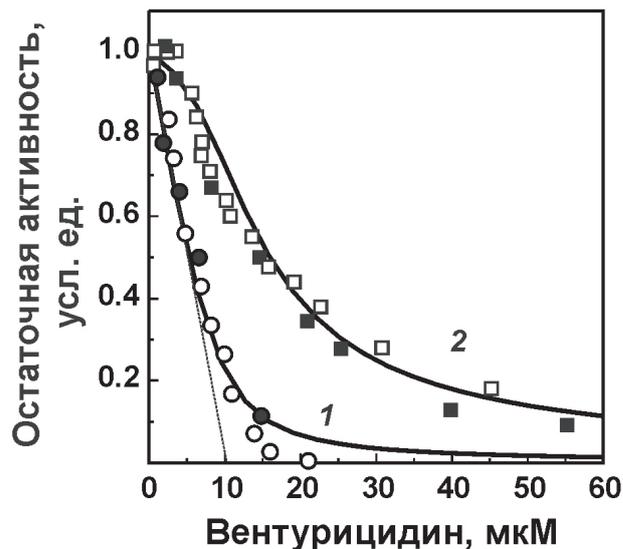


Рис. 5. Влияние вентурицидина на синтез и гидролиз АТФ в условиях генерации *pmf* на мембране. СБЧ (19 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 0,25 мМ сахарозу, 10 мМ Tris-ацетат (pH 7,3), 0,1 М малонат и 1 мМ MgCl₂, с вентурицидином в концентрациях, указанных на оси абсцисс. Аликвоты СБЧ вносили в 2 мл стандартной среды и через 1 мин инициировали синтез АТФ (кривая 1) (●, ○) добавлением 200 мкМ ADP, а АТФ-зависимый обратный перенос (кривая 2) (■, □) – одновременным внесением 1 мМ NAD⁺, 0,5 мМ KCN и 0,5 мМ АТФ. Начальные скорости реакций измеряли по ответу фенолового красного (синтез АТФ) или восстановлению NAD⁺ (гидролиз АТФ). Представлены результаты двух независимых экспериментов (●, ■; и ○, □)

такого совпадения выбрали суммарную невязку – сумму квадратов разностей экспериментальных значений и расчетных. Концентрацию формы [E₁]₀ (АТФ-синтаза) можно оценить экстраполяцией прямой на ось абсцисс графика, представленного на рис. 5 (около 10 мкМ или 0,53 нмоль/мг белка СБЧ). Задачу поиска значений параметров [E₁]₀, [E₂]₀, K₁ и K₂, сообщающих суммарной невязке (как целевой функции) наименьшее значение, решали как методом Монте-Карло, так и с помощью оптимизационной процедуры SLSQP, входящей в пакет SciPy 1.7.1 для программного пакета Python 3.8.8. Удовлетворительное совпадение теоретических кривых и экспериментальных данных мы получили при следующих параметрах: [E₁]₀ = 8,4 мкМ, [E₂]₀ = 3 мкМ, K₁ = 0,85 мкМ, K₂ = 6,3 мкМ. Таким образом, общая концентрация F_o:F₁ ([E₁]₀ + [E₂]₀) может составлять в условиях нашего эксперимента около 12 мкМ или 0,6 нмоль/мг белка СБЧ, что соответствует оценкам, полученным в работах по определению чувствительности F_o:F₁ к вентурицидину [24], и по определению содержания прочносвязанных нуклеотидов [43]. Нужно отметить, что мембраны *P. denitrificans* характеризуются высоким, по

сравнению с другими мембранными комплексами, содержанием $F_0 \cdot F_1$. Методом нативного электрофореза было показано, что АТР-синтаза (комплекс V) представляет собой основной компонент мембран СБЧ [44]. Расчетные равновесные константы диссоциации вентурицидина для синтетазной и гидролазной форм комплекса, которые мы рассматриваем только как оценочные, отличаются почти на порядок.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение многих лет внимание нашей группы было сосредоточено на проблеме обратимости функционирования $F_0 \cdot F_1$ комплекса и была предложена гипотеза о существовании двух различных состояний $F_0 \cdot F_1$ комплекса митохондрий: АТР-гидролазного и АТР-синтазного [18, 21]. Экспериментальная проверка этой гипотезы была затруднена отсутствием надежных препаратов, обладающих соизмеримыми скоростями синтеза и гидролиза. Такие препараты, как правило, получали путем обработки мембран ингибиторами АТРазы (DCCD, олигомицин), что осложняло интерпретацию результатов. После введения в практику нашей лаборатории мембранных препаратов почвенной бактерии *P. denitrificans*, обладающих высоким сопряжением [27] и катализирующих синтез АТР с высокими скоростями [23], а также обнаружения способов стимуляции их латентной АТРазной активности [24, 25] стало возможным сравнение двух реакций.

Чтобы экспериментально различить две формы $F_0 \cdot F_1$ (АТРаза и АТР-синтаза), был осуществлен детальный анализ чувствительности синтеза и гидролиза АТР к вентурицидину, специфическому высокоаффинному ингибитору стадии транслокации протонов. Значительные различия во взаимодействии этого ингибитора и фермента, обнаруживаемые при регистрации прямой и обратной реакции, служат веским аргументом против общепринятого взгляда на АТРаза/АТР-синтазу как на обратимый функционирующий комплекс.

В этой работе мы впервые предложили измерять скорость гидролиза АТР в реакции, сопряженной с энергозависимым обратным переносом электронов на NAD^+ , катализируемым комплексом I дыхательной цепи *P. denitrificans*, чтобы исключить влияние разобщения на связывание вентурицидина с комплексом $F_0 \cdot F_1$. Это позволило нам не использовать разобщитель при измерении АТРазной активности и анализировать влияние вентурицидина на прямую и обратную реакции в условиях энергиза-

ции мембраны СБЧ. Применяв этот подход, мы продемонстрировали разную чувствительность синтеза и гидролиза АТР к вентурицидину. Сравнение кривых титрования АТРазной активности СБЧ, измеренной двумя разными способами (рис. 3 и 5), показывает, что энергизация мембраны не влияет на сродство фермента к ингибитору.

Результаты настоящей работы противоречат широко распространенному мнению, согласно которому АТРаза $F_0 \cdot F_1$ -типа действуют как обратимые химико-электромеханические молекулярные машины, и подтверждают гипотезу, выдвинутую А.Д. Виноградовым [21], о существовании в сопрягающих мембранах двух форм $F_0 \cdot F_1$, которые он назвал неравновесными, имея в виду, что время их жизни многократно превышает время каталитического оборота. Кинетические свойства одной из форм наилучшим образом приспособлены для *pmf*-зависимого синтеза АТР, а другой — для АТР-зависимой генерации *pmf*. Полученные результаты удовлетворительно описываются моделью взаимодействия ингибитора с двумя формами фермента, обладающими различным сродством к ингибитору (см. Приложение, раздел II). Эффективное связывание малых концентраций ингибитора с формой фермента с более высоким сродством (АТР-синтаза) позволяет форме с более низким сродством (АТР-гидролаза) в тех же условиях сохранять свою активность, что приводит к появлению сигмоидальности в области низких концентраций вентурицидина (рис. 5). Если предположить, что одна единственная форма фермента в зависимости от условий измерения активности быстро, то есть со скоростями, сравнимыми с катализом, приобретает либо «синтетазную», либо «гидролазную» конформации, обладающие различной чувствительностью к вентурицидину, следовало бы ожидать линейное титрование обеих активностей в области низких концентраций ингибитора, однако полученные результаты (рис. 5) опровергают такую альтернативу.

Возможное существование двух форм фермента и однонаправленное функционирование $F_0 \cdot F_1$ можно объяснить некоторыми различиями в наборе субъединиц, входящих в состав комплекса (например, регуляторных субъединиц, таких как бактериальная ϵ -субъединица и открытая в α -протеобактериях ζ -субъединица). Наличие или отсутствие некоторых субъединиц может приводить к изменению общей структуры фермента и появлению возможности работать по механизму «храповика с собачкой», позволяющему вращение c -кольца фермента только в одном направлении [45, 46]. В

ряде работ действительно была продемонстрирована гетерогенность F₀·F₁-АТРаза/синтазы. Так, при попытке получить кристаллы F₀·F₁ из *P. denitrificans* были обнаружены два типа АТРаза, из которых удалось хорошо закристаллизовать только один. Авторы обнаружили, что два типа комплексов F₀·F₁ отличались по составу мембранных липидов, связанных с ферментом [47]. В другой работе обнаруженную функциональную гетерогенность F₀·F₁-АТРаза/синтазы объяснили тем, что некоторые комплексы содержали характерную для *P. denitrificans* ингибиторную ζ-субъединицу, а другие ее утратили [48].

Недавно появились работы, в которых механизм действия «односторонних» ингибиторов, мишенью для которых служит F₀-часть комплекса, связывают с нарушением функциональной связи между транслокацией протонов и вращением γ-субъединицы или даже с диссоциацией F₁ [49, 50]. Однако обнаруженные эффекты проявляются при высоких концентрациях вентурицидина, тогда как наиболее сильное различие в действии ингибитора в нашей работе мы наблюдали на начальном участке кривой титрования (рис. 5). Кроме того, если бы такой механизм реализовался, то возникающее разобщение приводило бы как к снижению скорости обратного переноса электронов, так и к падению, а не росту АТРазной активности, которую наблюдали авторы этих работ.

В настоящее время АТРаза F₀·F₁ рассматривают как хорошую молекулярную мишень для лекарственных соединений при лечении различных заболеваний [28], таких как туберкулез [51], заболевания сердечно-сосудистой системы [52] и онкологические заболевания

[53]. Недавно было показано, что вентурицидин потенцирует ингибирующий эффект аминогликозидных антибиотиков в отношении возбудителей туберкулеза [54]. Результаты нашей работы и ее основа — гипотеза о двух формах ферментного комплекса — могут помочь при разработке лекарственных агентов, направленных на F₀·F₁-АТРаза/синтазу.

Вклад авторов. Т.В. Жарова — руководство работой и проведение экспериментов; Т.В. Жарова, В.Г. Гривенникова, В.С. Козловский — обсуждение результатов исследования, В.С. Козловский — разработка математической модели; Т.В. Жарова, В.Г. Гривенникова — написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00106).

Благодарности. Мы с особой теплотой вспоминаем Андрея Дмитриевича Виноградова, выдающегося ученого, нашего учителя, бесценно руководившего нашей лабораторией и воспитавшего не одно поколение ученых, успешно работавших и работающих в настоящее время в России и за рубежом. Мы бесконечно благодарны ему за долгие годы совместной работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walker, J. E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1-16, doi: 10.1042/BST20110773
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature*, **370**, 621-628, doi: 10.1038/370621a0.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinosita, K. Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F₁-ATPase, *Nature*, **386**, 299-302, doi: 10.1038/386299a0.
- Boyer, P.D. (1998) Energy, life, and ATP, *Biosci. Rep.*, **18**, 97-117, doi: 10.1023/a:1020188311092.
- Schulz, S., Wilkes, M., Mills, D. J., Kühlbrandt, W., and Meier, T. (2017) Molecular architecture of the N-type ATPase rotor ring from *Burkholderia pseudomallei*, *EMBO Rep.*, **18**, 526-535, doi: 10.15252/embr.201643374.
- Kühlbrandt, W. (2019) Structure and mechanisms of F-type ATP synthases, *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 515-549, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-110903.
- Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase — a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717-749, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717.
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., et al. (2004) Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase, *Nature*, **427**, 465-468, doi: 10.1038/nature02212.
- Al-Shawi, M. K., Ketchum, C. J., and Nakamoto, R. K. (1997) The *Escherichia coli* F₀·F₁ gamma M23K uncoupling mutant has a higher K_{0.5} for P_i. Transition state analysis of this mutant and others reveals that synthesis and hydrolysis utilize the same kinetic pathway, *Biochemistry*, **36**, 12961-12969, doi: 10.1021/bi971478r.

10. Weber, J., and Senior, A. E. (2000) ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 300-309, doi: 10.1016/s0005-2728(00)00082-7.
11. Schwerzmann, K., and Pedersen, P. L. (1986) Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex, *Arch. Biochem. Biophys.*, **250**, 1-18, doi: 10.1016/0003-9861(86)90695-8.
12. Васильева Е. А., Панченко М. В., Виноградов А. Д. (1989) Взаимодействие АТФазы субмитохондриальных фрагментов и природного белка-ингибитора в условиях генерации $\Delta\mu_{H^+}$ на мембране, *Биохимия*, **54**, 1490-1498.
13. Lee, C., and Ernster, L. (1968) Studies of the energy-transfer system of submitochondrial particles. 2. Effects of oligomycin and aurovertin, *Eur. J. Biochem.*, **3**, 391-400, doi: 10.1111/j.1432-1033.1967.tb19542.x.
14. Robertson, A. M., Holloway, C. T., Knight, I. G., and Beechey, R. B. (1968) A comparison of the effects of NN'-dicyclohexylcarbodi-imide, oligomycin A and aurovertin on energy-linked reactions in mitochondria and submitochondrial particles, *Biochem. J.*, **108**, 445-456, doi: 10.1042/bj1080445.
15. Syroeshkin, A. V., Vasilyeva, E. A., and Vinogradov, A. D. (1995) ATP synthesis catalyzed by the mitochondrial F_1-F_0 ATP synthase is not a reversal of its ATPase activity, *FEBS Lett.*, **366**, 29-32, doi: 10.1016/0014-5793(95)00487-t.
16. Bald, D., Amano, T., Muneyuki, E., Pitard, B., Rigaud, J. L., et al. (1998) ATP synthesis by F_0F_1 -ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition, *J. Biol. Chem.*, **273**, 865-870, doi: 10.1074/jbc.273.2.865.
17. García, J. J., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. J. (1995) Inhibition by trifluoperazine of ATP synthesis and hydrolysis by particulate and soluble mitochondrial F_1 : competition with $H_2PO_4^-$, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27** 127-136, doi: 10.1007/BF02110340.
18. Виноградов А. Д. (1984) Каталитические свойства АТФ-синтетазы митохондрий, *Биохимия*, **49**, 1220-1238.
19. Gao, Y. Q., Yang, W., and Karplus, M. (2005) A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F_1 -ATPase, *Cell*, **123**, 195-205, doi: 10.1016/j.cell.2005.10.001.
20. Vinogradov, A. D. (2000) Steady-state and pre-steady-state kinetics of the mitochondrial F_0F_1 ATPase: is ATP synthase a reversible molecular machine? *J. Exp. Biol.*, **203**, 41-49, doi: 10.1242/jeb.203.1.41.
21. Виноградов А. Д. (2019) Новый взгляд на проблему обратимости синтеза и гидролиза АТФ F_0F_1 -АТФазой (гидролазой), *Биохимия*, **84**, 1553-1563, doi: 10.1134/S0320972519110034.
22. John, P., and Whatley, F. R. (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion, *Nature*, **254**, 495-498, doi: 10.1038/254495a0.
23. Perez, J. A., and Ferguson, S. J. (1990) Kinetics of oxidative phosphorylation in *Paracoccus denitrificans*. 1. Mechanism of ATP synthesis at the active site(s) of F_0F_1 -ATPase, *Biochemistry*, **29**, 10503-10518, doi: 10.1021/bi00498a013.
24. Pacheco-Moises, F., García, J. J., Rodriguez, J. S., and Moreno-Sanchez, R. (2000) Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* F_0F_1 -ATPase, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 993-1000, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01088.x.
25. Жарова Т. В., Виноградов А. Д. (2003) Протон-транслоцирующая АТФ-синтетаза *Paracoccus denitrificans*: АТФ-гидролазная активность, *Биохимия*, **68**, 1370-1380.
26. 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, doi: 10.1074/jbc.M311397200.
27. Кегярикова К. А., Жарова Т. В., Виноградов А. Д. (2010) Протон-транслоцирующая АТФаза *Paracoccus denitrificans*: кинетика окислительного фосфорилирования, *Биохимия*, **75**, 1424-1434.
28. Hong, S., and Pedersen, P. L. (2008) ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 590-641, doi: 10.1128/MMBR.00016-08.
29. Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2017) Functional heterogeneity of $F_0F_1H^+$ -ATPase/synthase in coupled *Paracoccus denitrificans* plasma membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 939-944, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.006.
30. Schafer, G. (1982) Differentiation of two states of F_1 -ATPase by nucleotide analogs, *FEBS Lett.*, **139**, 271-275, doi: 10.1016/0014-5793(82)80868-5.
31. Vinogradov, A. D. (1998) Catalytic properties of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) and the pseudo-reversible active/inactive enzyme transition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 169-185, doi: 10.1016/s0005-2728(98)00026-7.
32. John, P., and Whatley, F. R. (1970) Oxidative phosphorylation coupled to oxygen uptake and nitrate reduction in *Micrococcus denitrificans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 342-352, doi: 10.1016/0005-2728(70)90225-2.
33. John, P., and Hamilton, W. A. (1970) Respiratory control in membrane particles from *Micrococcus denitrificans*, *FEBS Lett.*, **10**, 246-248, doi: 10.1016/0014-5793(70)80639-1.
34. Chance, B., and Nishimura, M. (1967) Sensitive measurements of changes of hydrogen ion concentration, *Methods Enzymol.*, **10**, 641-650, doi: 10.1016/0076-6879(67)10106-7.
35. Waggoner, A. S. (1979) The use of cyanine dyes for the determination of membrane potentials in cells, organelles, and vesicles, *Methods Enzymol.*, **55**, 689-695, doi: 10.1016/0076-6879(79)55077-0.
36. Perlin, D. S., Latchey, L. R., and Senior, A. E. (1985) Inhibition of *Escherichia coli* H^+ -ATPase by venturicidin, oligomycin and osamycin, *Biochim. Biophys. Acta*, **807**, 238-244, doi: 10.1016/0005-2728(85)90254-3.
37. Linnett, P. E., and Beechey, R. B. (1979) Inhibitors of the ATP synthetase system, *Methods Enzymol.*, **55**, 472-518, doi: 10.1016/0076-6879(79)55061-7.
38. Grivennikova, V. G., Roth, R., Zakharova, N. V., Hagerhall, C., and Vinogradov, A. D. (2003) The mitochondrial and prokaryotic proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductases: similarities and dissimilarities of the quinone-junction sites, *Biochim. Biophys. Acta*, **1607**, 79-90, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.09.001.
39. Kotlyar, A. B., and Borovok, N. (2002) NADH oxidation and NAD^+ reduction catalysed by tightly coupled inside-out vesicles from *Paracoccus denitrificans*, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4020-4024, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03091.x.

40. Grivennikova, V. G., Kotlyar, A. B., Karliner, J. S., Cecchini, G., and Vinogradov, A. D. (2007) Redox-dependent change of nucleotide affinity to the active site of the mammalian complex I, *Biochemistry*, **46**, 10971-10980, doi: 10.1021/bi7009822
41. Gladyshev, G. V., Grivennikova, V. G., and Vinogradov, A. D. (2018) FMN site-independent energy-linked reverse electron transfer in mitochondrial respiratory complex I, *FEBS Lett.*, **592**, 2213-2219, doi: 10.1002/1873-3468.13117.
42. 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_o-F₁ ATP synthase, *Biochemistry*, **45**, 14552-14558, doi: 10.1021/bi061520v.
43. Harris, D. A., John, P., and Rada, G. K. (1977) Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase, and their role in oxidative phosphorylation. I. The *Paracoccus denitrificans* system, *Biochim. Biophys. Acta*, **459**, 546-559, doi: 10.1016/0005-2728(77)90053-6.
44. Morales-Rios, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernandez, G., Rodríguez-Zavala, J. S., Celis, H., et al. (2010) A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F₁F_o ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria, *FASEB J.*, **24**, 599-607, doi: 10.1096/fj.09-137356.
45. Guo, H., Suzuki, T. and Rubinstein, J. L. (2019) Structure of a bacterial ATP synthase, *eLife*, **8**, e43128, doi: 10.7554/eLife.43128.
46. Mendoza-Hoffmann, F., Pérez-Oseguera, Á., Cevallos, M. Á., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., et al. (2018) The biological role of the ζ subunit as unidirectional inhibitor of the F₁ F_o-ATPase of *Paracoccus denitrificans*, *Cell Rep.*, **22**, 1067-1078, doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.106.
47. Morales-Rios, E., Watt, I. N., Zhang, Q., Ding, S., Fearnley, I. M., et al. (2015) Purification, characterization and crystallization of the F-ATPase from *Paracoccus denitrificans*, *Open Biol.*, **5**, 150119, doi: 10.1098/rsob.150119.
48. Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., and García-Trejo, J. J. (2018) Unidirectional regulation of the F₁F_o-ATP synthase nanomotor by the ζ pawl-ratchet inhibitor protein of *Paracoccus denitrificans* and related α-proteobacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 762-774, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.06.005.
49. Guo, H., Courbon, G. M., Bueler, S. A., Mai, J., Liu, J., et al. (2021) Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline, *Nature*, **589**, 143-147, doi: 10.1038/s41586-020-3004-3.
50. Milgrom, Y. M., and Duncan, T. D. (2021) Complex effects of macrolide venturicidins on bacterial F-ATPases likely contribute to their action as antibiotic adjuvants, *Sci. Rep.*, **11**, 13631, doi: 10.1038/s41598-021-93098-8.
51. Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H. W., Neefs, J. M., et al. (2005) A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, **307**, 223-227, doi: 10.1126/science.1106753.
52. Patel, B. A., D'Amico, T. L., and Blagg, B. S. J. (2020) Natural products and other inhibitors of F₁F_o ATP synthase, *Eur. J. Med. Chem.*, **207**, 112779, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112779.
53. Wang, T., Ma, F., and Qian, H. L. (2021) Defueling the cancer: ATP synthase as an emerging target in cancer therapy, *Mol. Ther. Oncolytics*, **23**, 82-95, doi: 10.1016/j.omto.2021.08.015.
54. Yarlagadda, V., Medina, R., and Wright, G. D. (2020) Venturicidin A, a membrane-active natural product inhibitor of ATP synthase potentiates aminoglycoside antibiotics, *Sci. Rep.*, **10**, 8134, doi: 10.1038/s41598-020-64756-0.

INTERACTION OF VENTURICIDIN AND F_o-F₁-ATPase/ATP SYNTHASE OF TIGHTLY COUPLED SUBBACTERIAL FRAGMENTS OF *Paracoccus denitrificans* UNDER MEMBRANE POTENTIAL GENERATION

T. V. Zharova^{1*}, V. S. Kozlovsky², and V. G. Grivennikova¹

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: tzharova2018@gmail.com

² Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Proton translocating F_o-F₁-ATPase/synthase catalyzes the synthesis and hydrolysis of ATP, and it is commonly considered to be a reversibly functioning complex. We have previously shown that venturicidin, a specific F_o-directed inhibitor, blocks the synthesis and hydrolysis of ATP with a significant differences in affinity [Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2017) *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 939-944]. In this paper, we have studied in detail the inhibition of F_o-F₁-ATPase/synthase by venturicidin in tightly coupled membranes of *Paracoccus denitrificans* under conditions of membrane potential generation. ATP hydrolysis was followed by the ATP-dependent succinate-supported NAD⁺ reduction (potential-dependent reverse electron transfer) catalyzed by the respiratory chain complex I. It has been demonstrated that membrane energization does not affect the affinity of F_o-F₁-ATPase/synthase for venturicidin. The dependence of the residual ATP synthase activity on the concentration of the venturicidin approximates a linear function, whereas for ATP hydrolysis this dependence was sigmoidal: at low concentrations of the inhibitor a significant inhibition of ATP synthesis is not accompanied by a decrease in the rate of hydrolysis. A model is proposed considering two different forms of F_o-F₁, one of which catalyzes the synthesis, and the second catalyzes the hydrolysis of ATP.

Keywords: F_o-F₁-ATPase/synthase, venturicidin, *Paracoccus denitrificans*