МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Лапашина Анна Сергеевна**

# Особенности и физиологическая роль ингибирования АТФазной активности протонной АТФ-синтазы магниевым комплексом АДФ

03.01.04 — Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова

**Научный руководитель** – ***Фенюк Борис Александрович****, кандидат биологических наук*

**Официальные оппоненты** – ***Манухов Илья Владимирович****, доктор биологических наук, Московский физико-технический институт, лаборатория молекулярной генетики, заведующий лабораторией*

***Рогов Антон Геннадьевич****, кандидат биологических наук, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, лаборатория биоэнергетики, научный сотрудник*

***Черепанов Дмитрий Александрович****, доктор физико-математических наук, Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, лаборатория нанофотоники, ведущий научный сотрудник*

Защита диссертации состоится 23 июня 2021 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.12 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: http://istina.msu.ru/dissertations/369807572/

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук Д.Б. Киселевский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы и предмет исследования.** Протонная АТФ-синтаза F-типа (комплекс $F_OF_1$) является одним из важнейших ферментов биоэнергетики. У прокариот она расположена в плазматической мембране, а у эукариот – во внутренней мембране митохондрий и в мембране тилакоидов хлоропластов. АТФ-синтаза катализирует синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, используя энергию трансмембранной разности электрохимического потенциала протонов ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$[1]), генерируемой ферментами цепей переноса электронов, бактериородопсинами или некоторыми мембранными переносчиками. При снижении активности этих ферментов АТФ-синтаза может генерировать $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ самостоятельно, используя энергию гидролиза АТФ. АТФ-синтаза состоит из двух субкомплексов: гидрофильного $F_1$, который связывает нуклеотиды и фосфат, и мембранного $F_O$, осуществляющего трансмембранный перенос протонов.

АТФазная активность АТФ-синтазы может достигать чрезвычайно высоких значений и в условиях низкой $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ может истощить запас АТФ в клетке. Для всех изученных АТФ-синтаз характерно неконкурентное ингибирование этой активности комплексом MgАДФ (АДФ-ингибирование). Связывание MgАДФ в каталитическом сайте в отсутствие фосфата может с некоторой вероятностью привести к переходу фермента в неактивную форму; в отсутствие ионов магния этого не происходит. Под воздействием $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ фермент ре-активируется. Выраженность и особенности АДФ-ингибирования у разных организмов неодинаковы. АТФазная активность $F_OF_1$ и $F_1$ митохондрий, хлоропластов и ряда бактерий (*Bacillus* sp. PS3, *Bacillus subtilis* и др.) значительно ингибируется MgАДФ; фосфат препятствует этому ингибированию и стимулирует гидролиз. У $F_OF_1$ *Escherichia coli*, однако, АДФ-ингибирование выражено слабо, и, в отличие от наблюдаемого на ферментах из

---

[1] Список использованных сокращений в порядке появления: $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ – трансмембранная разность электрохимического потенциала протонов, СБЧ – суббактериальные мембранные частицы, АСМА – 9-амино-6-хлоро-2-метоксиакридин, Фн – неорганический фосфат, $Sp^R$ – устойчивый к спектиномицину, $Cm^R$ – устойчивый к хлорамфениколу.

других организмов, усиливается, а не ослабляется фосфатом. Вероятно, *E. coli* в составе кишечной флоры позвоночных в основном использует АТФ-синтазу как АТФ-зависимый генератор $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$; сильное ингибирование АТФазной активности для этого организма может оказаться невыгодным. Таким образом, можно предположить, что «сильное» или «слабое» АДФ-ингибирование является результатом эволюционного приспособления к тем или иным условиям жизни. Тем не менее, физиологическая роль АДФ-ингибирования до сих пор не получила экспериментального подтверждения. Кроме того, молекулярный механизм АДФ-ингибирования, а также структурные предпосылки различий в его свойствах у разных организмов остаются неизвестными.

Настоящая работа посвящена исследованию механизма АДФ-ингибирования в АТФ-синтазе бактерий и его значения *in vivo*. Для экспериментов использовали два модельных организма с разными свойствами АДФ-ингибирования: *E. coli* («слабое», усиливается в присутствии неорганического фосфата) и *B. subtilis* («сильное», ослабляется в присутствии фосфата).

**Цели исследования:** найти аминокислотные остатки, определяющие свойства АДФ-ингибирования АТФазной активности АТФ-синтазы бактерий (выраженность, модуляция неорганическим фосфатом) и, изменяя свойства АДФ-ингибирования с помощью точечного мутагенеза по найденным позициям, показать влияние АДФ-ингибирования на выживаемость бактериальных клеток.

Для достижения поставленных целей были сформулированы и выполнены следующие **задачи:** 1) Используя множественное выравнивание каталитических субъединиц β бактериальных АТФ-синтаз, отобрать позиции с ограниченной консервативностью, которые, с одной стороны, не являются критически важными для катализа, но вместе с тем могли бы участвовать в регуляции активности фермента; 2) изменяя тип аминокислотного остатка по отобранным позициям, исследовать роль этих остатков в АДФ-ингибировании

АТФ-синтазы двух организмов с разными типами ингибирования (*E. coli*, *B. subtilis*); 3) получить геномных мутантов бактерий с «сильным» и «слабым» АДФ-ингибированием и сравнить параметры роста полученных штаммов.

**Научная новизна исследования.** В ходе работы найден единичный аминокислотный остаток, в заметной степени влияющий на свойства АДФ-ингибирования, а также несколько других остатков, чья роль в АДФ-ингибировании оказалась минорной. Кроме того, в ходе работы удалось показать физиологическую значимость выраженного АДФ-ингибирования у *B. subtilis*; насколько известно автору работы, этот результат представляет собой первое экспериментальное свидетельство роли АДФ-ингибирования *in vivo*.

**Практическая значимость исследования.** Понимание механизмов работы и регуляции АТФ-синтазы необходимо для создания эффективных бактериальных штаммов-продуцентов в биотехнологии. Кроме того, в силу заметных различий между АТФ-синтазами бактерий и митохондрий, $F_OF_1$ является удобной мишенью для разработки антибактериальных средств. Для многих патогенных микроорганизмов функционирование АТФ-синтазы является жизненно необходимым; у других наличие активной АТФ-синтазы повышает вирулентность. Исследование отличительных регуляторных особенностей АТФ-синтазы бактерий делает возможной разработку новых антибактериальных препаратов, селективно блокирующих этот фермент у патогенных организмов, и поэтому представляет заметный практический интерес.

**Положения, выносимые на защиту**

1) Замена L249Q в субъединице β АТФ-синтазы *E. coli* усиливает ингибирование АТФазной активности фермента комплексом MgАДФ, а также меняет характер фосфат-зависимой регуляции активности.

2) Обратная замена в гомологичной позиции (βQ259L) в АТФ-синтазе *B. subtilis*, напротив, приводит к ослаблению АДФ-ингибирования.

3) Мутантный штамм *B. subtilis* с ослабленным АДФ-ингибированием

АТФазной активности АТФ-синтазы вытесняется штаммом дикого типа из смешанных культур при аэробном росте. Таким образом, в этих условиях сильное АДФ-ингибирование, свойственное дикому типу, дает бактериям конкурентное преимущество.

**Методология и методы диссертационного исследования.** Исследование выполнено с применением классических методов биоинформатики, генной инженерии, биохимии и микробиологии.

**Степень достоверности полученных результатов.** Приведенные в работе данные получены с использованием современных методов исследований; полученные результаты являются статистически достоверными и воспроизводимыми. Все измерения проводились как минимум в троекратной повторности.

**Личный вклад соискателя** присутствовал на всех этапах работы: подбор и анализ литературы, планирование и проведение экспериментов, обработка и анализ данных, интерпретация результатов, подготовка результатов к публикации, написание статей и представление результатов работы на семинарах и конференциях.

**Апробация результатов работы.** Результаты работы были доложены на заседании научного семинара Ученого совета НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. Кроме того, автор неоднократно представляла результаты разных этапов работы на Европейской конференции по биоэнергетике (2012 г., Фрайбург-им-Брайсгау, Германия; 2014 г., Лиссабон, Португалия; 2018 г., Будапешт, Венгрия).

**Структура диссертации.** Работа построена по стандартному плану и содержит разделы: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 153 страницах печатного текста, содержит 37 рисунков и 6 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 375 работ.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

*Сайт-направленный мутагенез и экспрессия АТФ-синтазы в E. coli.* Экспрессию проводили в штамме *E. coli* BW25113 с геномной делецией оперона АТФ-синтазы (*Δunc*). Для экспрессии использовали плазмиду pFV2, кодирующую все субъединицы АТФ-синтазы *E. coli*; на N-конец субъединицы β добавлен гексагистидиновый тег. Фермент, синтезируемый на pFV2 без дополнительных мутаций, ниже обозначается как «фермент *E. coli* дикого типа». Введение точечных мутаций в последовательность pFV2 проводилось с помощью мегапраймерной ПЦР.

*Мутагенез в геноме B. subtilis.* Замена Q259L была введена непосредственно в последовательность гена субъединицы β АТФ-синтазы в хромосоме *B. subtilis* (штамм 168) согласно методике Н. Закатаевой и соавторов (Zakataeva et al. 2010).

*Получение препаратов для биохимических исследований.* Свойства АТФ-синтазы *E. coli* исследовали на 1) суббактериальных мембранных частицах (СБЧ), полученных с помощью Френч-пресса; 2) препаратах $F_1$-субкомплекса, полученных из СБЧ с использованием хлороформной экстракции и очищенных с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе; 3) препаратах целого $F_OF_1$, полученных из СБЧ с помощью экстракции детергентами, очищенных на Ni-NTA агарозе (Ishmukhametov et al. 2005) и реконструированных в липосомы из соевого фосфатидилхолина (P5638, Sigma-Aldrich, США). Свойства АТФ-синтазы *B. subtilis* исследовали на СБЧ, полученных с помощью лизоцима и Френч-пресса.

*Измерения ферментативной активности.* АТФазную активность измеряли спектрофотометрически 1) с помощью pH-индикатора фенолового красного по закислению среды, сопровождающему гидролиз АТФ при pH > 7,2; 2) в ферментной АТФ-регенерирующей системе, где гидролиз АТФ сопряжен с окислением NADH. Для наблюдений за трансмембранным переносом протонов использовали краситель ACMA. АТФ-синтетазную активность измеряли в

люциферин-люциферазной системе.

**Результаты и обсуждение**

*Выбор аминокислотных остатков для мутагенеза*

Поскольку АДФ-ингибирование происходит в результате «застревания» MgАДФ в каталитическом сайте фермента, поиск аминокислотных остатков, которые могли бы определять его свойства, вели среди остатков, принадлежащих каталитической субъединице β. Множественное выравнивание было получено на основе базы данных COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins), содержащей 711 полных геномов бактерий и архей и равномерно покрывающей их филогенетическое древо (Galperin et al. 2015). Финальный набор содержал 492 последовательности β-субъединиц $F_OF_1$ эубактерий.

Анализ множественного выравнивания выявил несколько полуконсервативных позиций. По этим позициям вошедшие в выравнивание организмы можно разбить на кластеры, в пределах которых остаток в каждой из позиций является консервативным. Так, у всех бета-протеобактерий (в выравнивание вошло 34 вида) и гамма-протеобактерий (в выравнивание вошло 62 вида и 2 штамма *E. coli*) в позициях β139, β158, β189, β249 и β319 находятся консервативные остатки фенилаланина, аспарагина, фенилаланина, лейцина и валина соответственно. Ферменты многих других эубактерий (а также митохондрий и хлоропластов) содержат в этих позициях консервативные остатки тирозина, лейцина, лейцина, глутамина и треонина соответственно. Частоты встречаемости аминокислотных остатков в этих позициях выравнивания приведены в таблице 1; серым цветом выделены остатки, наблюдаемые в ферменте *E. coli*, других гамма-протеобактерий, а также бета-протеобактерий.

На основании полуконсервативности этих остатков можно предположить их участие в регуляции активности фермента. В таком случае тип остатка в одной или нескольких из этих позиций мог бы определять специфику регуляции фермента конкретного организма. В ходе настоящей работы каждый из перечисленных остатков *E. coli* был поочередно заменен на

| **Таблица 1.** Частоты встречаемости (в %) аминокислотных остатков в исследуемых позициях множественного выравнивания субъединиц β АТФ-синтаз эубактерий. Номера позиций (в верхней строке) даны в соответствии с нумерацией остатков в ферменте *E. coli.* Остатки, наблюдаемые в данных позициях в ферменте *E. coli* и других гамма-протеобактерий, выделены светло-серым. | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Номер позиции** | **β139** | **β158** | **β189** | **β249** | **β319** |
| | Y 60,14 | L 52,69 | L 73,66 | Q 73,31 | T 62,05 |
| | F 37.61 | N 24,61 | F 25,65 | L 26,52 | V 30,16 |
| | I 1,04 | I 16,29 | M 0,69 | M 0,17 | I 6,07 |
| | V 0,52 | V 2,95 | | | L 1,39 |
| | L 0,52 | T 2,77 | | | A 0,17 |
| | M 0,17 | M 0,35 | | | M 0,17 |

соответствующий гомолог из фермента бацилл, митохондрий и хлоропластов (βF139Y, βN158L, βF189L, βL249Q и βV319T). Был также получен двойной мутант βF139Y+βV319T, поскольку в структуре фермента *E. coli* эти два остатка соседствуют. Для проверки влияния каждой из мутаций на свойства АТФ-синтазы *E. coli* измеряли активность СБЧ штамма *E. coli*, экспрессирующего соответствующий фермент. Для одной из замен, βN158L, не удалось найти условий, в которых бы свойства мутантного фермента отличались от фермента дикого типа. Еще три мутации: βF139Y, βF189L, βV319T и двойная замена βF139Y+βV319T – лишь в небольшой степени повлияли на АТФазную активность фермента. Так, измерения начальной скорости гидролиза 1 мМ АТФ практически не выявили различий между диким типом и мутантами. Тем не менее, добавление АДФ вместе с АТФ в меньшей степени подавляло АТФазную активность СБЧ, полученных из мутантных штаммов. Кроме того, замены βF189L и βV319T несколько ослабили ингибирование АТФазной активности фосфатом в присутствии АДФ. Эти результаты подробно описаны в тексте диссертации и указывают на участие остатков βF139, βF189 и βV319 в механизме АДФ-ингибирования у *E. coli* и его модуляции фосфатом. Однако наиболее яркий эффект на активность АТФ-синтазы *E. coli* оказала замена βL249Q – о ней и пойдет речь ниже.

*Замена βL249Q усиливает АДФ-ингибирование АТФ-синтазы E. coli и влияет на модуляцию ее активности фосфатом*

Для исследования влияния замены βL249Q на активность АТФ-синтазы *E. coli* измеряли активность очищенного субкомплекса $F_1$, а также целого $F_OF_1$ в составе СБЧ и протеолипосом. АТФазную активность $F_1$ измеряли в АТФ-регенерирующей системе. В таких условиях активность $F_1$ с заменой βL249Q была в несколько раз ниже, чем активность $F_1$ дикого типа (4,9±0,3 и 28,7±4,6 ед/мг белка соответственно, рис. 1).

Добавление сульфита, который, как известно, облегчает диссоциацию ингибиторного АДФ из каталитического сайта фермента и препятствует АДФ-ингибированию, не оказывало значительного влияния на АТФазную активность $F_1$-комплекса дикого типа, однако в заметной степени стимулировало активность мутантного $F_1$. В присутствии 8 мМ сульфита АТФазная активность мутантного $F_1$ по своей величине приближалась к активности фермента дикого типа (рис. 1Б). Это позволяет предположить, что в $F_1$ с мутацией βL249Q АДФ-ингибирование выражено сильнее, чем в ферменте дикого типа.

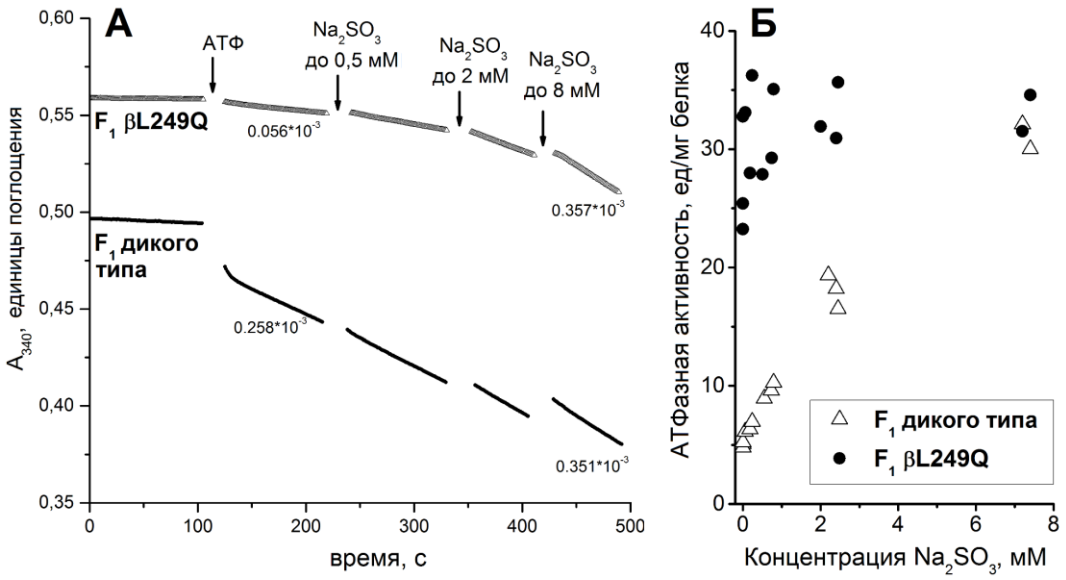



**Рис. 1.** АТФазная активность $F_1$ *E. coli* дикого типа и с заменой βL249Q, измеряемая в АТФ-регенерирующей системе. **А**, экспериментальные кривые. Реакцию начинали добавлением АТФ до 1 мМ, затем добавляли сульфит натрия. Приведены значения скорости падения поглощения NADH при 0 и 8 мМ сульфита. Концентрация $F_1$ составляла 0,26 нМ. **Б**, зависимость АТФазной активности от концентрации сульфита. Единица активности соответствует гидролизу 1 мкмоль АТФ за минуту.

| **Таблица 2.** Начальная АТФазная активность СБЧ и протеолипосом, содержащих $F_OF_1$ *E. coli* дикого типа и с заменой βL249Q, измеренная по закислению среды. Приведены средние (по трем повторам) значения активностей в ед/мг белка ± среднеквадратичные отклонения. Разобщитель – смесь валиномицина и нигерицина (до 500 нМ каждого). | | | |
|---|---|---|---|
| | | **Дикий тип** | **βL249Q** |
| **СБЧ** | без разобщителя | 5,15±0,88 | 0,59±0,12 |
| | + разобщитель | 7,08±1,32 | 0,74±0,14 |
| **Протеолипосомы** | без разобщителя | 9,87±1,38 | 0,84±0,13 |
| | + разобщитель | 20,9±2,67 | 1,32±0,24 |

Влияние мутации βL249Q на активность целого $F_OF_1$ *E. coli* исследовали на СБЧ и на липосомах, содержащих очищенные ферменты дикого типа или мутанта. Измеренная с помощью фенолового красного удельная (на мг мембранного белка) АТФазная активность СБЧ с мутантным ферментом была приблизительно в десять раз ниже активности СБЧ, полученных из штамма *E. coli* с АТФ-синтазой дикого типа (таблица 2). Схожий результат, полученный на препаратах протеолипосом, указывает на то, что низкая активность СБЧ мутанта не связана со снижением уровня экспрессии АТФ-синтазы.

Для прямой проверки сопряжения между гидролизом АТФ и транспортом протонов $F_OF_1$ в составе протеолипосом использовали краситель АСМА, флуоресценция которого гасится при возникновении градиента pH на мембране (рис. 2). АТФ-зависимое падение флуоресцентного сигнала наблюда-

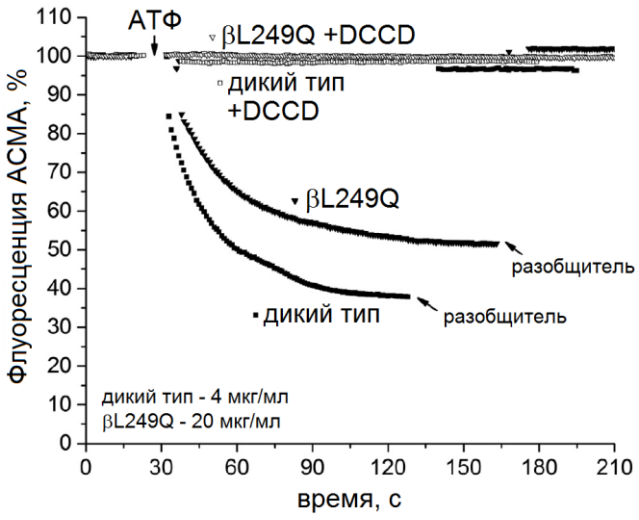



**Рис. 2**. АТФ-зависимое гашение флуоресценции АСМА в образцах протеолипосом, содержащих $F_OF_1$ *E. coli* дикого типа или с заменой βL249Q. Концентрация $F_OF_1$ в образцах указана в нижнем левом углу. К образцам добавляли спиртовой раствор DCCD (до 100 мкМ) или такой же объем этанола и инкубировали при 37°С в течение 20 мин, после чего вносили АТФ до 500 мкМ. После выхода сигнала на плато к не содержащим DCCD образцам добавляли разобщитель (смесь валиномицина и нигерицина до 500 нМ каждого). Измерения проводили при комнатной температуре.

ли в случае обоих образцов (с $F_OF_1$ дикого типа и с мутантным ферментом) – т.е. мутантный фермент сохранил сопряжение между гидролизом АТФ и переносом протонов через мембрану.

Способность мутантного фермента катализировать синтез АТФ проверяли на СБЧ. Для генерации $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ферментами дыхательной цепи к суспензии СБЧ добавляли сукцинат. Скорость синтеза АТФ СБЧ, содержащими мутантный $F_OF_1$, оказалась сопоставимой со скоростью синтеза АТФ СБЧ с ферментом дикого типа (0,2±0,01 и 0,26±0,04 ед на мг мембранного белка соответственно; приведены рассчитанные из трех повторов средние ± среднеквадратичные отклонения, на рис. 3 представлены экспериментальные кривые). Этот результат позволяет заключить, что мутация βL249Q не оказала значительного влияния на синтез АТФ.

Для оценки выраженности АДФ-ингибирования в $F_OF_1$ *E. coli* дикого типа и с заменой βL249Q в составе протеолипосом вновь измеряли сульфит-зависимую активацию гидролиза АТФ. В первой серии опытов гидролиз регистрировали по закислению среды. Поскольку энергизация мембраны термодинамически ограничивает АТФазную активность мембранного $F_OF_1$, эти измерения производили в присутствии разобщителя. При гидролизе 1 мМ АТФ протеолипосомами с $F_OF_1$ дикого типа добавление 5 мМ сульфита приводило лишь к незначительной активации (рис. 4, А). В то же время, в случае липосом,

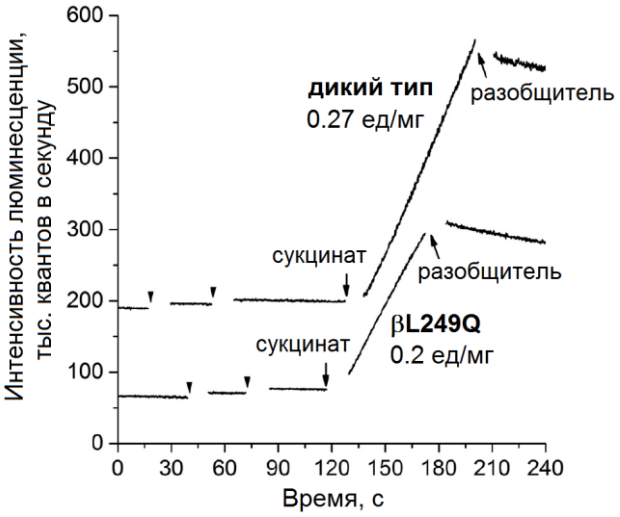



**Рис. 3**. Синтез АТФ СБЧ *E. coli*, содержащими $F_OF_1$ дикого типа или с заменой βL249Q. Маленькие стрелки – калибровочные добавки АТФ до 100 нМ каждая. Синтез АТФ запускали добавлением сукцината натрия до 4 мМ и прекращали добавлением разобщителя (смесь валиномицина и нигерицина до 500 нМ каждого). Концентрация мембранного белка в образцах составляла 54 мкг/мл.

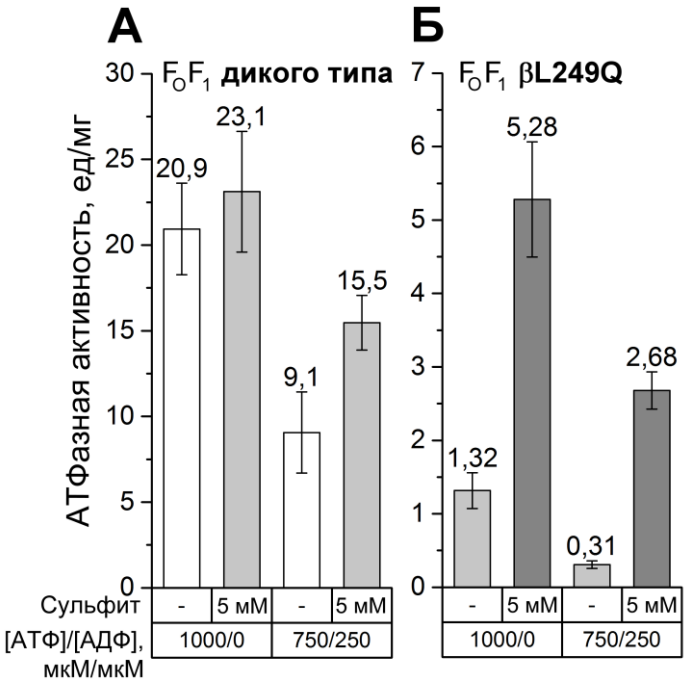



**Рис. 4**. Гидролиз АТФ протео липосомами с $F_OF_1$ *E. coli* дикого типа (**А**) или βL249Q (**Б**). Гидролиз измеряли при 37°С по закислению среды. Над столбцами указаны средние ± рассчитанные из трех повторов среднеквадратичные отклонения. Реакцию начинали добавлением смеси АТФ/АДФ до концентраций, приведенных в нижней строке. Концентрации $F_OF_1$ составляли: дикий тип – 8 мкг/мл без добавки АДФ и 24 мкг/мл при добавлении АДФ; βL249Q – 58 мкг/мл без добавки АДФ и 124 мкг/мл при добавлении АДФ. Эксперимент проводили в условиях разобщения мембраны (буфер содержал смесь валиномицина и нигерицина до 500 нМ каждого).

содержащих фермент с заменой βL249Q, сульфит активировал гидролиз 1 мМ АТФ примерно в четыре раза (рис. 4, Б). В случае, когда реакцию начинали одновременным добавлением АТФ до 750 мкМ и АДФ до 250 мкМ, стимулирующее действие сульфита на АТФазную активность наблюдалось на обоих типах ферментов, однако в случае фермента дикого типа оно было выражено заметно слабее, чем в случае фермента с заменой βL249Q (соответственно в два раза и в девять раз, рис. 4). Само по себе добавление АДФ вместе с АТФ без сульфита неодинаково влияло на АТФазную активность $F_OF_1$ дикого типа и мутанта (рис. 4А, белые столбцы, и Б, светло-серые столбцы): более выраженное падение активности наблюдалось на ферменте с заменой βL249Q.

Поскольку метод измерения АТФазной активности по закислению среды не дает возможности проводить эксперименты в присутствии больших концентраций веществ с буферными свойствами (в случае сульфита – более 5 мМ), влияние сульфита на АТФазную активность протеолипосом было исследовано в АТФ-регенерирующей системе, где также присутствовал разобщитель (рис. 5). В этих условиях сульфит в концентрации до 5 мМ не влиял на $F_OF_1$ дикого типа, однако активировал мутантный фермент в несколько раз. В присутствии 5 мМ сульфита АТФазная активность $F_OF_1$ с

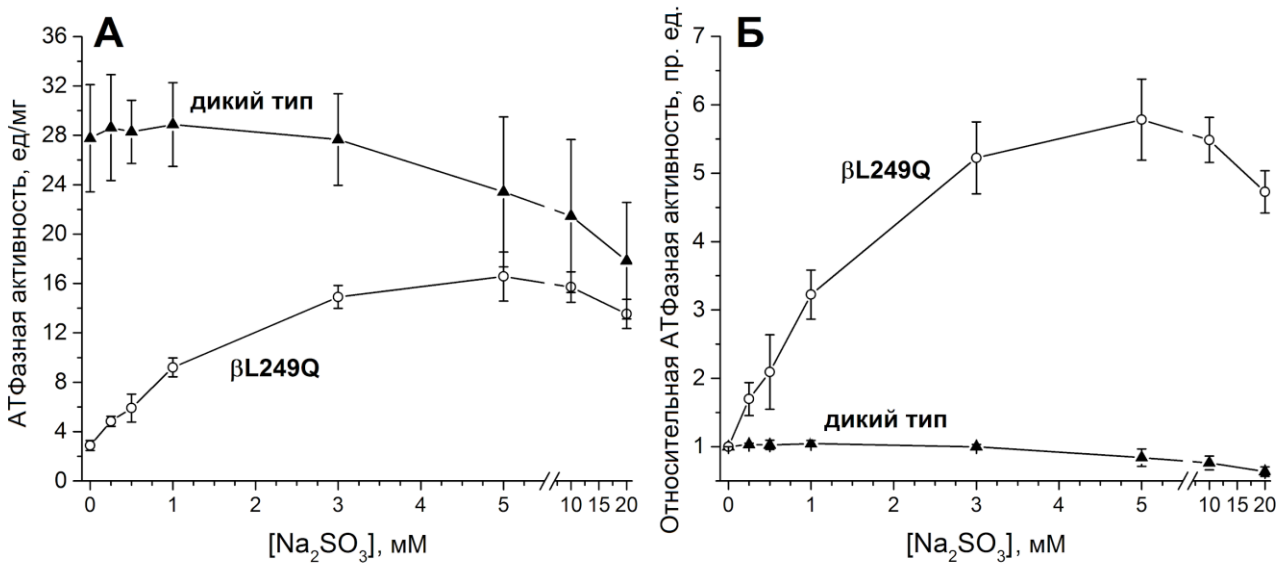



**Рис. 5.** Гидролиз АТФ протеолипосомами, содержащими $F_OF_1$ E. coli дикого типа (▲) или с заменой βL249Q (○) в АТФ-регенерирующей системе при 37°C. Показаны средние ± среднеквадратичные отклонения, рассчитанные из четырех повторов. На панелях А и Б представлены результаты одного и того же эксперимента: **А**, абсолютные значения АТФазной активности (мкМ АТФ в секунду на мг белка), **Б**, активности нормированы на среднюю величину активности в отсутствие сульфита. Гидролиз начинали добавлением АТФ до 1 мМ. Измерения проводили в присутствии разобщителя (валиномицин+нигерицин, до 500 нМ каждого).

заменой βL249Q составляла около 70% от величины активности фермента дикого типа, хотя в отсутствие сульфита активности двух $F_OF_1$ различались на порядок величины.

Отсутствие сульфит-зависимой стимуляции (или слабая стимуляция) АТФазной активности $F_OF_1$ и $F_1$ *E. coli* дикого типа вкупе с многократной стимуляцией активности мутантных $F_OF_1$ и $F_1$ (рис. 1, 4 и 5) позволяют предполагать, что низкая АТФазная активность мутантного $F_OF_1$ в отсутствие сульфита обусловлена выраженным ингибиторным действием MgАДФ. При добавлении сульфита мутантный фермент освобождается от АДФ-ингибирования, и активности ферментов с мутацией и дикого типа выравниваются. Таким образом, можно заключить, что замена βL249Q усиливает АДФ-ингибирование в ферменте *E. coli*.

Кроме относительно слабого АДФ-ингибирования, $F_OF_1$ *E. coli* дикого типа обладает еще одним свойством, отличающим его от других исследованных АТФ-синтаз. Согласно обширным литературным данным, АТФ-

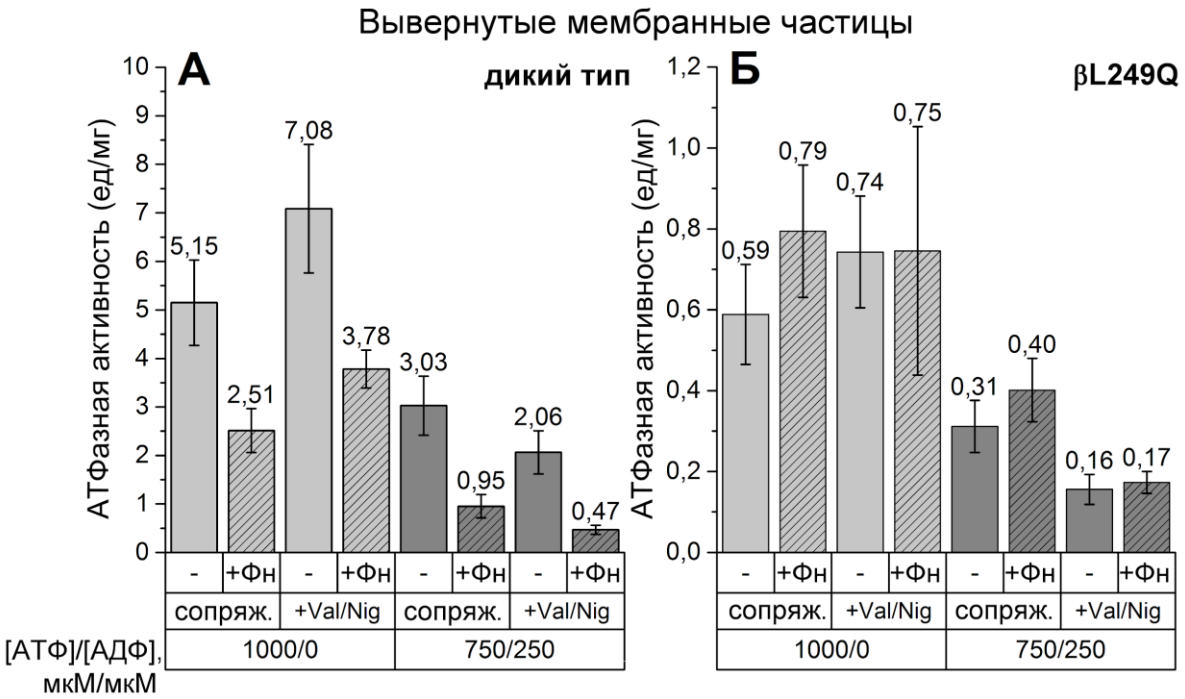



**Рис. 6.** Гидролиз АТФ СБЧ, полученными из клеток *E. coli*, экспрессирующих рекомбинантный $F_OF_1$ *E. coli* (**А**) дикого типа или (**Б**) с заменой βL249Q. Скорость реакции измеряли при 37°C по закислению среды. Показаны усредненные активности, рассчитанные из 7 кривых, ± стандартное отклонение. Гидролиз начинали добавкой АТФ до 1 мМ или смеси АТФ/АДФ до 750 мкМ и 250 мкМ соответственно. В указанных случаях буфер также содержал 3 мМ $K_2HPO_4$ (обозначен как Фн, неорганический фосфат) или разобщитель (смесь валиномицина и нигерицина, 500 нМ каждого, обозначен как Val/Nig).

азная активность $F_OF_1$ митохондрий, хлоропластов и некоторых бактерий стимулируется неорганическим фосфатом, поскольку в его присутствии ослабляется АДФ-ингибирование. В случае фермента *E. coli*, однако, фосфат усиливает АДФ-ингибирование и подавляет гидролиз АТФ (Fischer et al. 2000). Из рис. 6 и 7 видно, что фосфат действительно ингибирует АТФазную активность $F_OF_1$ *E. coli* дикого типа. В присутствии 3 мМ фосфата скорость гидролиза 1 мМ АТФ СБЧ штамма *E. coli*, несущего pFV2 дикого типа, оказалась вдвое ниже измеренной в тех же условиях активности СБЧ без добавления фосфата к среде (рис. 6, А). АТФазная активность очищенного $F_OF_1$ *E. coli* дикого типа в составе липосом также ингибировалась фосфатом, причем этот эффект в большей степени проявлялся в разобщающих условиях: фосфат лишь незначительно снижал АТФазную активность липосом с $F_OF_1$ дикого типа в отсутствие разобщителя, однако при добавлении последнего снижал скорость гидролиза вдвое (рис. 7, А). Ингибиторное влияние фосфата на АТФазную

активность $F_OF_1$ дикого типа проявлялось ещё заметнее, когда одновременно с АТФ к образцам добавляли АДФ (до 250 мкМ). В этом случае фосфат ингибировал гидролиз АТФ ферментом дикого типа в 3-4 раза как на СБЧ, так и на протеолипосомах; добавление разобщителя усиливало этот эффект (рис. 6, А и 7, А). Замена βL249Q, однако, разительным образом изменила характер фосфат-зависимой регуляции АТФазной активности $F_OF_1$ *E. coli*. Добавление фосфата до 3 мМ практически не влияло на АТФазную активность СБЧ, содержащих мутантный $F_OF_1$ (рис. 6, Б). Более того, на протеолипосомах, содержащих $F_OF_1$ с заменой βL249Q, фосфат стимулировал АТФазную активность (рис. 7, Б). При добавлении АДФ или разобщителя к суспензии липосом с мутантным ферментом стимулирующий эффект фосфата был выражен сильнее, а максимальная активация (в 2,6 раз) наблюдалась в случае, когда к образцам добавляли и АДФ, и разобщитель. Ожидалось, что именно в разобщающих условиях ингибиторное влияние MgАДФ на АТФазную активность будет наиболее выраженным, поскольку известно, что $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ препятствует переходу фермента в АДФ-ингибированное состояние. Таким об-

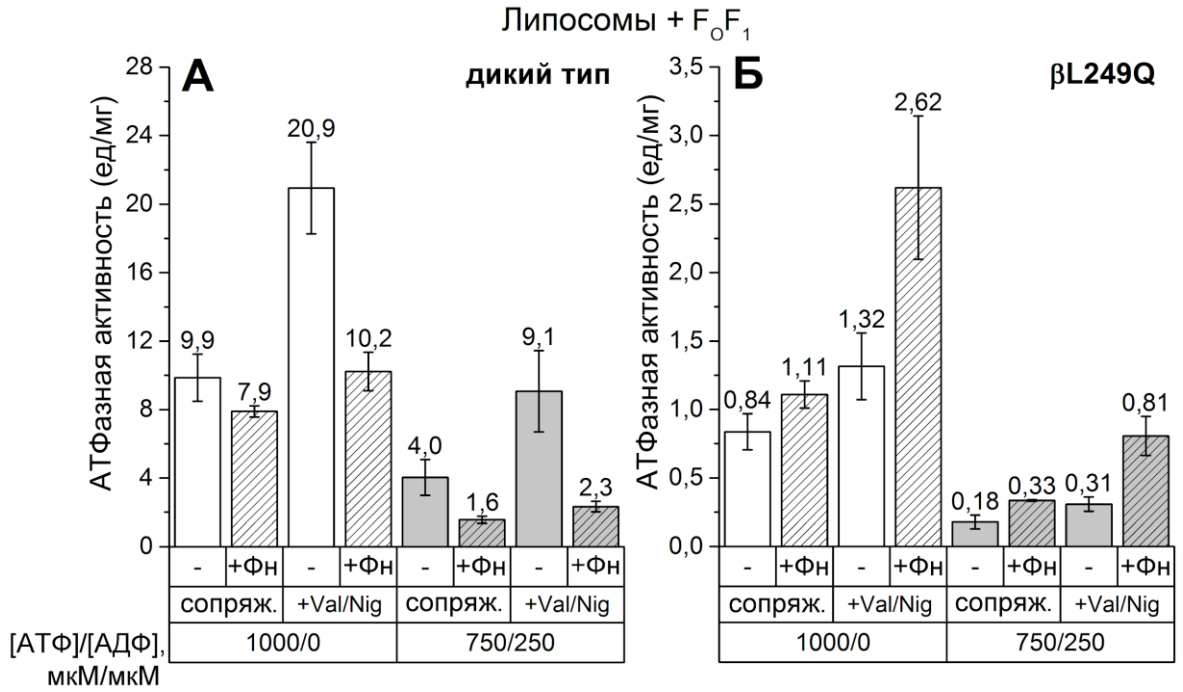



**Рис. 7.** Гидролиз АТФ протеолипосомами, содержащими $F_OF_1$ *E. coli* (**А**) дикого типа или (**Б**) с заменой βL249Q. Скорость реакции измеряли при 37°С по закислению среды. Показаны усредненные активности, рассчитанные из 3 кривых, ± стандартное отклонение. Условия эксперимента аналогичны рис. 6. Шкала по оси ординат разная на А и Б.

разом, можно предположить, что стимулирующее действие фосфата на АТФ-азную активность мутантного $F_OF_1$ *E. coli* с заменой βL249Q связано с ослаблением АДФ-ингибирования – как было показано для ферментов других бактерий, а также хлоропластов и митохондрий.

Активность липосом, содержащих $F_OF_1$ дикого типа или с заменой βL249Q, была также измерена в сопряженной АТФ-регенерирующей системе (рис. 8). В отличие от описанных выше экспериментов, в которых в среде измерения присутствовал АДФ, в АТФ-регенерирующей системе добавление фосфата до 3 мМ снижало активность фермента дикого типа приблизительно на 20%, а в случае мутантного фермента приводило к небольшой активации гидролиза. Кроме того, в этом эксперименте присутствие разобщителя не оказывало значительного влияния на наблюдаемые эффекты. При добавлении фосфата до 20 мМ снижение АТФазной активности наблюдалось и у фермента

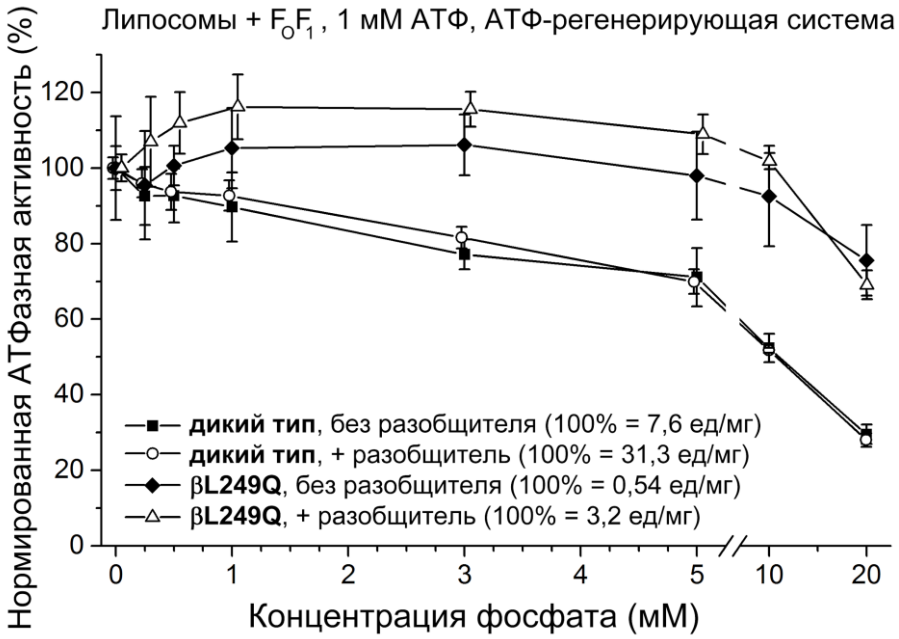



**Рис. 8.** Гидролиз 1 мМ АТФ протеолипосомами, содержащими $F_OF_1$ *E. coli* дикого типа или с заменой βL249Q. Скорость гидролиза измеряли в АТФ-регенерирующей системе при 37°C, добавляя к среде неорганический фосфат (Фн) до указанных концентраций. Значения АТФазной активности нормировали на активность протеолипосом с соответствующим ферментом без добавления фосфата; для каждой кривой приведены абсолютные значения активностей, соответствующие 100%. Точками показаны рассчитанные из 4 повторов средние ± среднеквадратичные отклонения. Гидролиз начинали добавлением АТФ до 1 мМ. Буфер содержал 2.5 мМ $MgCl_2$. Разобщитель – смесь валиномицина и нигерицина, 500 нМ каждого).

дикого типа, и у мутантного $F_OF_1$, однако мутантный фермент терял лишь 20% активности, а фермент дикого типа ингибировался на 80%.

Таким образом, полученные в ходе работы данные свидетельствуют о том, что замена βL249Q изменила «знак» действия неорганического фосфата на АТФазную активность $F_OF_1$ *E. coli*. Согласно структурной модели $F_1$ *E. coli*, полученной при помощи рентгеноструктурного анализа (запись 3OAA в базе данных Protein Data Bank), остаток βL249 расположен неподалеку от каталитического сайта в щели между субъединицами α и β на расстоянии приблизительно 1,2 нм от места связывания фосфата. Возможно, мутация βL249Q меняет пространственную ориентацию боковой цепи остатка βR246, которая находится между сайтом связывания фосфата (место которого в структуре 3OAA занято сульфат-ионом) и остатком β249. Гуанидиновая группа βR246 взаимодействует с двумя атомами кислорода фосфата. Если замена лейцина на глутамин в позиции β249 приводит к нарушению этого взаимодействия, она может в значительной степени влиять на связывание фосфата в каталитическом сайте.

*Обратная замена βQ259L ослабляет АДФ-ингибирование АТФ-синтазы B. subtilis и приводит к снижению жизнеспособности клеток*

Представленные выше данные позволяют считать, что тип аминокислотного остатка в позиции, соответствующей β249 АТФ-синтазы *E. coli*, в значительной мере определяет степень выраженности АДФ-ингибирования: остаток лейцина (дикий тип *E. coli*) соответствует «слабому» АДФ-ингибированию, а остаток глутамина – «сильному». В отличие от фермента *E. coli*, АТФ-синтаза *B. subtilis* более чувствительна к АДФ-ингибированию и содержит остаток глутамина в позиции β259, гомологичной β249 *E. coli*. В таком случае замена βQ259L в АТФ-синтазе *B. subtilis* должна была бы привести к ослаблению АДФ-ингибирования и повысить АТФазную активность. Для проверки этой гипотезы использовали СБЧ *B. subtilis* штамма 168, содержащие нативную АТФ-синтазу (дикий тип) или фермент с геномной мутацией βQ259L без дополнительных модификаций.

Начальная АТФазная активность СБЧ *B. subtilis* с заменой βQ259L, измеряемая по закислению среды при добавлении АТФ до 1 мМ, оказалась втрое выше активности СБЧ дикого типа, измеряемой в тех же условиях (рис. 9). В случае, когда реакцию запускали добавлением смеси АТФ/АДФ в соотношении 1:1 (до 0,5 мМ каждого), разница между активностями СБЧ дикого типа и мутанта была выражена сильнее. Сопоставляя активности СБЧ каждого из штаммов в зависимости от добавления АДФ, можно видеть, что мутация снизила уровень АДФ-зависимой инактивации гидролиза: если в диком типе при добавке АДФ активность снизилась более чем в 4 раза (0,13 ед/мг мембранного белка без АДФ и 0,03 ед/мг при его добавлении), то у мутанта βQ259L активность упала лишь в 1,5 раза (0,44 ед/мг без АДФ и 0,27 ед/мг с АДФ; см. рис. 9, А). Можно предположить, что повышенная АТФазная активность СБЧ мутантного штамма связана с ослабленным АДФ-ингибированием.

Диссипация $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ (добавка разобщителя) привела к активации гидролиза СБЧ обоих штаммов (рис. 9, Б); этот эффект связан со снятием термодинамического ограничения, которое $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ на мембране накладывает на АТФаз-

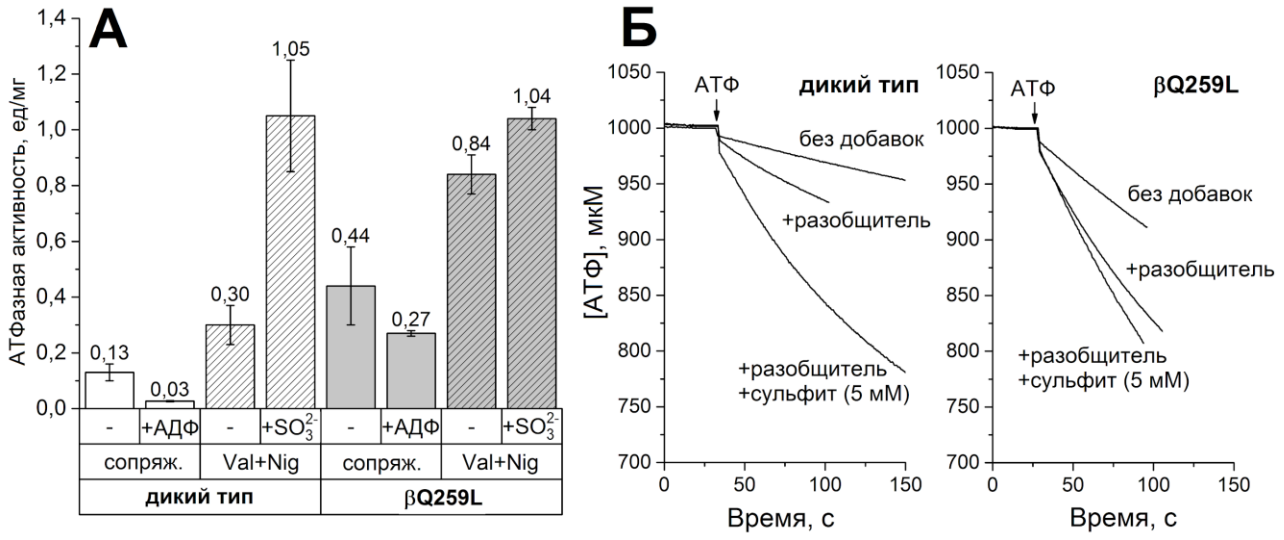



**Рис. 9.** АТФазная активность СБЧ *B. subtilis*, измеренная по закислению среды. **А**, усредненная начальная активность; приведены средние ± среднеквадратичные отклонения, рассчитанные из трех и более повторов; 1 ед/мг соответствует гидролизу 1 мкмоль АТФ в минуту на мг мембранного белка; **Б**, репрезентативные кривые; концентрация мембранного белка в образцах 0,17 мг/мл. Реакцию начинали добавлением АТФ до 1 мМ или смеси АТФ/АДФ до 0,5 мМ каждого. В указанных случаях буфер содержал разобщитель (смесь валиномицина и нигерицина, 500 нМ каждого) и/или 5 мМ $Na_2SO_3$.

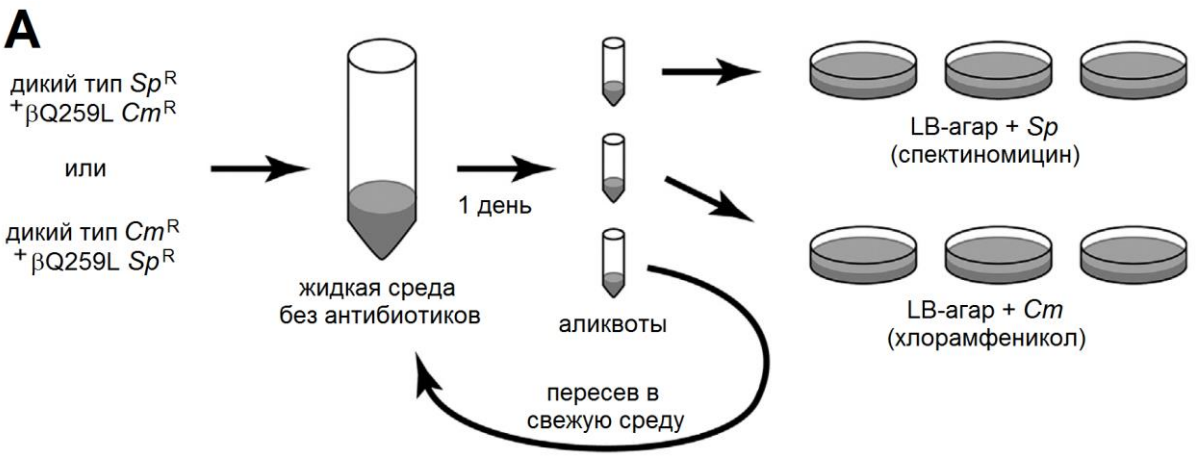
ную активность. Однако и на разобщенных СБЧ разница в активностях между двумя штаммами сохранилась: СБЧ мутантного штамма гидролизовали АТФ более чем в два раза быстрее (рис. 9, А). Стоит отметить,что мутация βQ259L не нарушила сопряжения между АТФазной активностью и трансмембранным транспортом протонов: об этом свидетельствуют результаты измерений с ACMA – флуоресцентным красителем, чувствительным к образованию ΔpH на мембране (данные приведены в тексте диссертации).

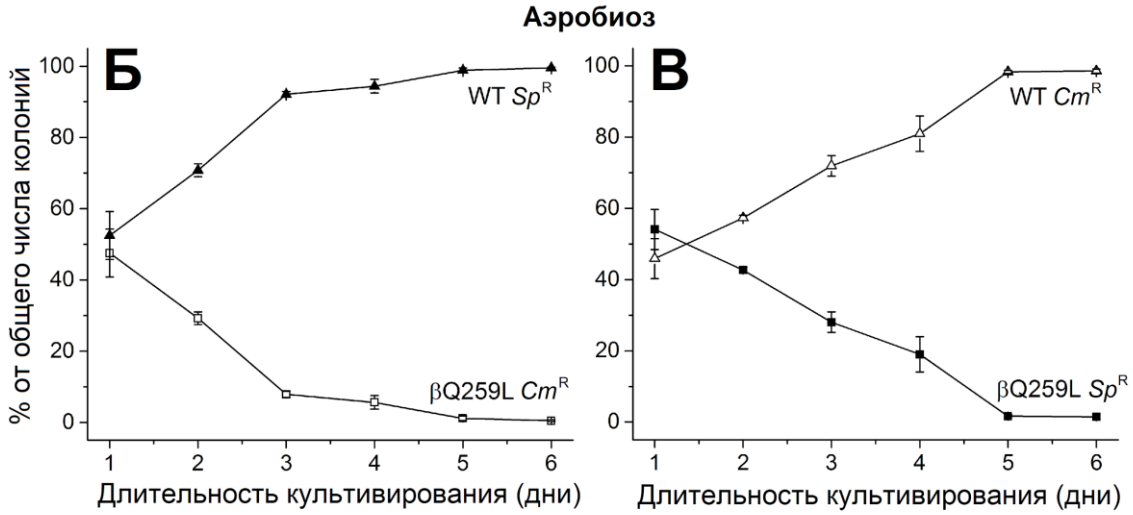
Влияние мутации на уровень АДФ-ингибирования также оценивали по степени активации гидролиза сульфитом в разобщающих условиях. Добавление сульфита до 5 мМ к разобщенным СБЧ *B. subtilis* дикого типа стимулировало их АТФазную активность примерно в 4 раза (рис. 9). В то же время влияние сульфита на СБЧ штамма βQ259L было заметно слабее (активация около 24%). Средние значения сульфит-стимулированных активностей СБЧ дикого типа и мутанта оказались весьма близки (1,04 ед/мг и 1,05 ед/мг соответственно, рис. 9, А). Все это позволяет предположить, что наблюдаемые эффекты мутации βQ259L в АТФ-синтазе *B. subtilis* связаны с ослаблением АДФ-ингибирования. В дополнение к результатам, полученным на *E. coli*, данные на *B. subtilis* подтверждают основной вывод этой работы: тип АДФ-ингибирования и (по крайней мере в случае *E. coli*) его модуляция фосфатом в значительной степени определяется единичным аминокислотным остатком субъединицы β (β259 у *B. subtilis* и его гомолог β249 у *E. coli*).

Несмотря на то, что роль АДФ-ингибирования в живой бактериальной клетке (защита от чрезмерной растраты АТФ в условиях снижения $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) является теоретически правдоподобной, ее экспериментальных подтверждений до сих пор не найдено. В этой связи представлялось интересным сравнить рост *B. subtilis* дикого типа и геномного мутанта βQ259L. Измерения кривых роста *B. subtilis* дикого типа и βQ259L в богатой среде в аэробных условиях не выявили заметных различий между двумя штаммами. Вероятно, в течение активного аэробного роста (в экспоненциальной фазе) на мембране клеток *B. subtilis* поддерживается уровень $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, достаточный для синтеза АТФ, и

АТФ-синтаза не проявляет АТФазной активности. Физиологическая роль АДФ-ингибирования могла бы проявиться в условиях дефицита дыхательных субстратов и/или кислорода – например, при оценке выживаемости клеток после стационара. Для проверки этой гипотезы штаммы *B. subtilis* дикого типа и мутанта βQ259L с разной устойчивостью к антибиотикам (к спектиномицину, $Sp^R$, или хлорамфениколу, $Cm^R$) растили в смешанных культурах (рис. 11, А). Штаммы засевали из чистых жидких культур до равных значений $OD_{600}$ в жидкую среду LB без антибиотиков, растили в течение суток, затем переносили в свежую среду. Соотношение жизнеспособных клеток дикого типа и мутанта в смешанных культурах определяли при каждом пересеве: культуры высевали на чашки Петри с селективной средой и подсчитывали количество колоний. Эксперимент продолжали до тех пор, пока один из штаммов полностью не вытеснял второй. Для исключения эффектов, связанных с устойчивостью к антибиотику и не имеющих отношения к АДФ-ингибированию, эксперименты проводили в двух вариантах: дикий тип $Sp^R$ + βQ259L $Cm^R$ либо дикий тип $Cm^R$ + βQ259L $Sp^R$ (рис. 11, Б-Д).

При выращивании в аэробных условиях (рис. 11, Б-В) штамм *B. subtilis* дикого типа полностью вытеснил мутанта βQ259L в течение 5 дней. В условиях пониженной аэрации, когда бактерий растили в доверху заполненных средой пробирках, штамм дикого типа вытеснял мутанта ещё быстрее (рис. 11, Г-Д). Таким образом, можно заключить, что в исследованных условиях «сильное» АДФ-ингибирование АТФазной активности АТФ-синтазы дает клеткам *B. subtilis* дикого типа конкурентное преимущество, а «слабое» АДФ-ингибирование у мутанта βQ259L приводит к снижению приспособленности. Этот результат представляет собой первое доказательство роли АДФ-ингибирования *in vivo* и подтверждает, что АДФ-ингибирование представляет собой регуляторную надстройку, тонко адаптирующую энергетический обмен клеток к условиям жизни, а не является «побочным эффектом» катализа.



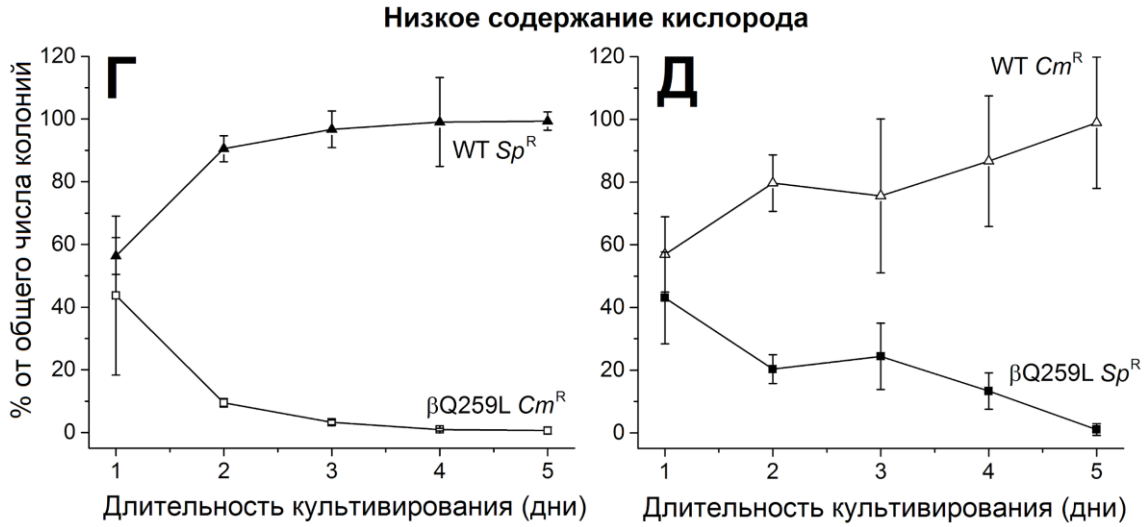




**Рис. 11**. Рост клеток *B. subtilis* дикого типа и мутанта βQ259L (с ослабленным АДФ-ингибированием) в смешанных культурах: **А**, схема эксперимента; **Б-В**, соотношение числа колониеобразующих единиц штаммов дикого типа и βQ259L в смешанных культурах при аэробном выращивании; **Г-Д** – то же, но культуры растили в условиях пониженной аэрации. Число колоний каждого штамма ($Sp^R$ или $Cm^R$) усредняли по трем повторам и нормировали на сумму двух средних ($Sp^R$+$Cm^R$, в %). Планки погрешностей соответствуют среднеквадратичным отклонениям.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляторные особенности АТФ-синтазы *E. coli* выделяют этот фермент среди остальных АТФ-синтаз, в достаточной степени исследованных биохимическими методами. В то время как АТФазная активность ферментов митохондрий, хлоропластов и ряда бактерий в значительной степени подвержена неконкурентному ингибированию MgАДФ и стимулируется фосфатом, АТФазная активность фермента *E. coli* слабо подвержена АДФ-ингибированию и снижается в присутствии фосфата. Настоящая работа ставила своей целью определить конкретные аминокислотные остатки, обусловливающие эти «особые» свойства АТФ-синтазы *E. coli*, и тем самым пролить свет на молекулярный механизм АДФ-ингибирования. В ходе работы удалось обнаружить несколько таких остатков. Вклад трех из них: βF139, βF189 и βV319 – не представляется значительным, однако еще один остаток – βL249 – по всей видимости играет ключевую роль и определяет низкую чувствительность фермента к АДФ-ингибированию. Замена этого лейцина на глутамин, характерный для ферментов с «сильным» АДФ-ингибированием, не оказала заметного влияния на сопряженность АТФ-синтазы и ее синтетазную активность, однако снизила АТФазную активность фермента, повысила уровень ее стимуляции сульфитом – веществом, ослабляющим АДФ-ингибирование, – а также усилила ингибиторный эффект АДФ, добавляемого непосредственно к реакционной смеси. Кроме того, эта замена кардинально изменила влияние неорганического фосфата на АТФазную активность: характерное для *E. coli* ингибиторное действие фосфата исчезло, а в некоторых условиях удалось наблюдать фосфат-зависимую активацию гидролиза АТФ. Все это указывает на то, что замена βL249Q изменила свойства АТФ-синтазы *E. coli*, сделав ее более похожей на ферменты митохондрий, хлоропластов и бацилл.

Полученный результат удалось подтвердить «зеркальными» экспериментами на *B. subtilis*, у которой замена гомологичного остатка глутамина на характерный для *E. coli* лейцин (βQ259L) привела к обратным эффектам:

повышению АТФазной активности, ослаблению ингибиторного влияния MgАДФ, а также снижению степени сульфит-зависимой активации гидролиза АТФ. Таким образом, тип остатка в позиции β259 у *B. subtilis* (β249 у *E. coli*) в значительной степени определяет свойства АДФ-ингибирования: лейцин – «слабое» ингибирование, глутамин – «сильное» и ослабляющееся неорганическим фосфатом; вероятно, этот вывод можно распространить и на другие, еще не исследованные АТФ-синтазы.

Наконец, найденная мутация, позволяющая менять выраженность АДФ-ингибирования у бактерий, дала возможность проверить физиологическую значимость АДФ-ингибирования как способа регуляции АТФазной активности АТФ-синтазы *in vivo*. Выращивание штаммов *B. subtilis* дикого типа и с ослабленным АДФ-ингибированием в смешанных культурах как в аэробных условиях, так и в условиях сниженной аэрации продемонстрировало, что сильное АДФ-ингибирование, характерное для нативной АТФ-синтазы *B. subtilis*, дает клеткам бактерий конкурентное преимущество и является эволюционно выгодным. Таким образом, можно заключить, что АДФ-ингибирование является не просто «побочным эффектом» катализа, но важной регуляторной надстройкой, позволяющей приспосабливать фермент под нужды клетки в соответствии с условиями ее жизни.

## ВЫВОДЫ

1) Аминокислотные остатки в позициях β139, β189 и β319 АТФ-синтазы *E. coli* принимают участие в модуляции АДФ-ингибирования фосфатом – однако их роль в этом процессе не очень значительна. Остаток в положении β158 не играет заметной роли в регуляции АТФазной активности фермента.

2) Степень выраженности АДФ-ингибирования у бактерий и его модуляция фосфатом в большой степени определяются единичным аминокислотным остатком в каталитической β-субъединице – β249 (нумерация *E. coli*). Остаток лейцина в этом положении соответствует слабому АДФ-

ингибированию, остаток глутамина – более выраженному.

3) У *B. subtilis* ослабление АДФ-ингибирования приводит к снижению приспособленности. По всей видимости, АДФ-ингибирование является не «побочным эффектом», сопутствующим катализу, но важным регуляторным механизмом, позволяющим тонко регулировать работу фермента в зависимости от условий жизни организма.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI


1. **Lapashina A.S.**, Prikhodko A.S., Shugaeva T.E., Feniouk B.A. Residue 249 in subunit beta regulates ADP inhibition and its phosphate modulation in Escherichia coli ATP synthase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 2019. Vol. 1860, № 3. P. 181–188. **Impact Factor (IF) – 4,579 (5 лет, рассчитан по базе данных Web of Science)**

2. **Lapashina A.S.**, Feniouk B.A. Mutation Q259L in subunit beta in Bacillus subtilis ATP synthase attenuates ADP-inhibition and decreases fitness in mixed cultures. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2019. Vol. 509, № 1. P. 102–107. **IF – 2,75**

3. **Лапашина А.С.**, Шугаева Т.Е., Березина К.М., Холина Т.Д., Фенюк Б.А. Аминокислотные остатки β139, β189 и β319 $H^+$-$F_OF_1$-АТФ синтазы *Escherichia coli*: влияние на АДФ-ингибирование. Биохимия. 2019. Т. 84, № 4. С. 407–415. **IF – 1,954**

4. **Лапашина А.С.**, Фенюк Б.А. АДФ-ингибирование H+-$F_0F_1$-АТФ синтазы. Биохимия. 2018. Т. 83, № 10. С. 1141–1160. **IF – 1,954**

5. Зубарева В.М., **Лапашина А.С.**, Шугаева Т.Е., Литвин А.В., Фенюк Б.А. Роторные ион-транслоцирующие АТФазы/АТФ-синтазы: разнообразие, общие черты и отличия. Биохимия. 2020. Vol. 85, № 12. P. 1613–1630. **IF – 1,954**


### Тезисы докладов и материалы конференций


1. **Lapashina A.S.**, Feniouk B.A. Biochemical properties of Escherichia coli FOF1-ATP synthase with Leu249Gln substitution in beta subunit // Biochimica

et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 2018. Vol. 1859. P. e80.

2. Shugaeva T.E., **Lapashina A.S.**, Feniouk B.A. The effect of point mutations in Escherichia coli H+-FOF1 ATP synthase on the MgADP-inhibition of ATPase activity // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 2018. Vol. 1859. P. e82.

3. **Lapashina A.S.**, Vitushkina M.V., Zinovkin R.A, Feniouk B.A. The effect of betaq259l mutation on MgADP-inhibition of B. subtilis H+-FOF1-ATP-synthase // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 2014. Vol. 1837. P. e16.

4. Feniouk B.A. Prikhodko A.S., **Lapashina A.S.**, Zinovkin R.A. The role of residue beta249 in MgADP inhibition of Escherichia coli ATP synthase // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 2014. Vol. 1837. P. e15.

5. Prikhodko A.S., **Lapashina A.S.**, Zinovkin R.A., Vitushkina M.V., Feniouk B.A. The effect of mutations γM23K and βL249Q on ADP-inhibition of H+-FOF1-ATP-synthase in Escherichia coli // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. Elsevier B.V., 2012. Vol. 1817. P. S22.