

$F_0 \cdot F_1$ АТФ-синтаза/АТРаза *PARACOCCLUS DENITRIFICANS*: ЗАГАДКА ОДНОНАПРАВЛЕННОГО КАТАЛИЗА

©2025 г.

Т. В. ЖАРОВА, В. Г. ГРИВЕННИКОВА

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биохимии, Москва

I. Введение. II. Структура и каталитические свойства $F_0 \cdot F_1$. III. Регуляция $F_0 \cdot F_1$: $ADP(Mg^{2+})$ -ингибирование и природные белки-ингибиторы. IV. *P. denitrificans* – природная модель однонаправленно функционирующего $F_0 \cdot F_1$. V. Механизм однонаправленной регуляции $F_0 \cdot F_1$ по принципу «храповик и собачка». VI. Гипотеза о двух формах $F_0 \cdot F_1$. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

У эукариот и аэробных бактерий основная часть клеточного аденозинтрифосфата (АТФ) образуется в результате совместной работы дыхательной цепи и $F_0 \cdot F_1$ АТФ-синтазы. Катализируемые дыхательной цепью окислительно-восстановительные реакции сопряжены с транслокацией протонов через сопрягающие мембраны, приводящей к образованию трансмембранного электрохимического градиента ионов водорода (протондвижущей силы, *pmf*). $F_0 \cdot F_1$ АТФ-синтазы используют *pmf* для синтеза АТФ из аденозиндифосфата (ADP) и неорганического фосфата (P_i) (рис. 1) [1, 2]. Синтезированный АТФ служит источником энергии для протекания в клетке энергозависимых реакций.

Во время частичного или полного коллапса *pmf* в отсутствие кислорода и/или альтернативных акцепторов электронов $F_0 \cdot F_1$ катализирует обратную реакцию, при которой гидролиз АТФ приводит к генерации *pmf*. Хотя некоторые бактерии в анаэробных условиях используют АТФ-зависимую генерацию *pmf* для хемотаксиса и процессов вторичного транспорта, высокая потребность клеток в АТФ привела к появлению нескольких механизмов, избирательно блокирующих гидролиз и предотвращающих тем самым бесполезный расход АТФ [3]. У многих бактерий, например, у *Paracoccus denitrificans* [4], *Bacillus sp.* [5] и *Mycobacterium sp.* [6, 7], АТФ-азная активность $F_0 \cdot F_1$ заметно ограничена. Так, например, $F_0 \cdot F_1$ -комплекс α -протеобактерии *P. denitrificans* известен как очень быстрая $F_0 \cdot F_1$ АТФ-синтаза, тогда как в направлении гидролиза АТФ фермент демонстрирует исключительно низкую активность. По сравнению с ферментами из *Escherichia coli* и митохондрий сердца быка, которые обладают соизмеримой активностью в прямой и обратной реакции, фермент *P. denitrificans* работает в 100 раз быстрее как АТФ-синтаза, чем как АТРаза [8–10].

Список сокращений: $F_0 \cdot F_1$ – H^+ -транспортирующая $F_0 \cdot F_1$ АТФ-синтаза/АТРаза; F_1 – гидрофильная часть $F_0 \cdot F_1$; F_0 – мембранная часть $F_0 \cdot F_1$; $PdF_0 \cdot F_1$ – $F_0 \cdot F_1$ *Paracoccus denitrificans*; *pmf* – трансмембранный электрохимический градиент ионов водорода, протондвижущая сила (*proton motive force, pmf*); P_i – неорганический фосфат; IF1 – белок-ингибитор митохондриальной $F_0 \cdot F_1$; СМЧ – субмитохондриальные частицы; LDAO – лаурилдиметиламиноксид; ϵ CTD – ингибирующий С-концевой домен ϵ -субъединицы.

Адрес для корреспонденции: tzharova2018@gmail.com

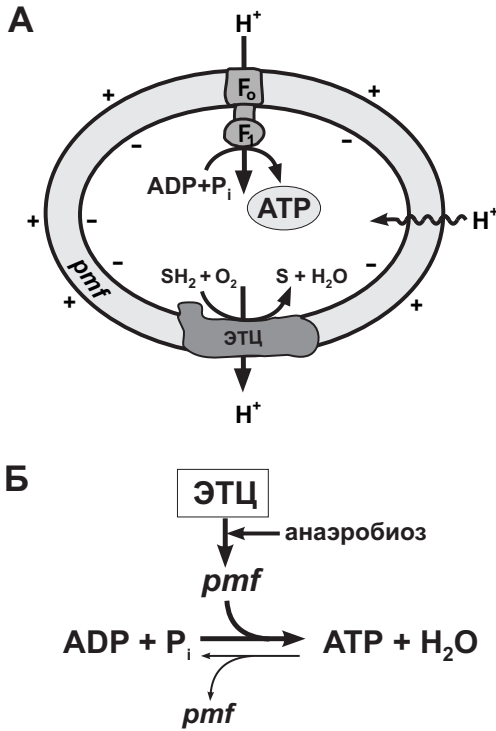


Рис. 1. Окислительное фосфорилирование в сопрягающих мембранах бактериальных клеток.

А. $F_0:F_1$ состоит из гидрофильного F_1 , который выполняет каталитическую функцию, и F_0 , обеспечивающего транслокацию протонов. Протондвижущая сила (*pmf*) генерируется электрон-транспортной цепью (ЭТЦ) и используется в бактериях, главным образом, для синтеза АТФ.

Б. К обращению реакции синтеза АТФ приводят рассеивание мембранного потенциала в результате анаэробноза и/или неспецифических протонных утечек (волнистая стрелка на рис. 1 А).

Механизмы регуляции $F_0:F_1$ в настоящее время точно не установлены, и, в связи с этим, избирательное ингибирование гидролиза АТФ вызывает повышенный интерес исследователей [11, 12]. Следует особенно отметить, что изучение регуляторных свойств $F_0:F_1$ ряда патогенных микроорганизмов [13], и, в особенности в микобактериях [7], односторонне катализирующих синтез, но не гидролиз АТФ, может иметь решающее значение для поиска новых антибактериальных лекарственных препаратов [14, 15].

В обзоре представлены последние данные о функционировании и регуляции $F_0:F_1$ АТФ-синтазы/АТФазы *P. denitrificans*, которую рассматривают как природную модель «односторонне» работающего фермента [4, 16, 17].

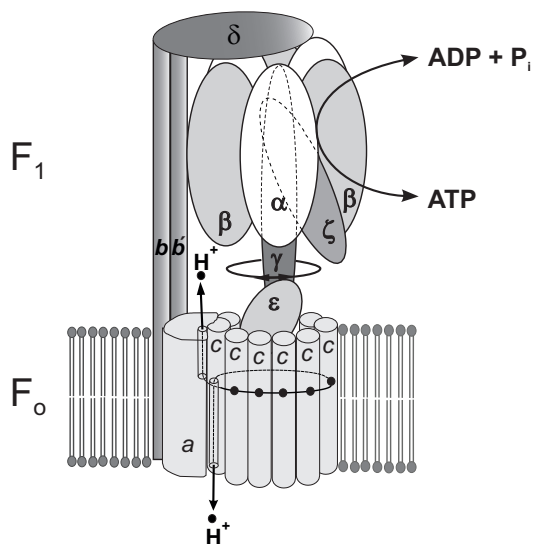
II. СТРУКТУРА И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА $F_0:F_1$

Знания о структуре $F_0:F_1$ АТФ-синтаз/АТФаз были получены благодаря усилиям в области рентгеновской кристаллографии [2, 18, 19]. Эти работы дали представление главным образом, о строении гидрофильной области фермента. Успешное применение криоэлектронной микроскопии высокого разрешения позволило установить большинство структур и для гидрофобных областей комплекса [19, 20].

Независимо от происхождения, все $F_0:F_1$ состоят из двух частей: гидрофильного F_1 , расположенного в матрице митохондрий или цитоплазме бактерий и катализирующего синтез или гидролиз АТФ, и встроенного в мембрану F_0 , переносящего ионы H^+ через мембрану. В интактном $F_0:F_1$ -комплексе обе части связаны центральным и периферическим стержнем и работают посредством хемомеханического вращательного механизма.

Рис. 2. Строение F₀-F₁ АТФ синтазы/АТРазы *P. denitrificans*.

Схема расположения субъединиц в F₀-F₁ АТФ-синтазе/АТРазе *P. denitrificans*. Кроме характерных для большинства бактериальных ферментов субъединиц статора (гексамер αββ₃, δ, гетеродимер bb' и a) и ротора (γ, ε и кольцо из 12 c-субъединиц) показана уникальная ингибиторная ζ-субъединица. Стрелками показаны направление вращения γ-субъединицы и трансмембранного переноса протонов в ходе реакций синтеза/гидролиза АТФ.



Бактериальный ферментный комплекс имеет простейший субъединичный состав: его F₁ состоит из пяти белков, называемых α, β, γ, δ и ε (рис. 2). Три субъединицы α и три субъединицы β поочередно собраны в гексамерную структуру, субъединица γ входит в центральную полость этого гексамера. Субъединица ε связана с γ, образуя центральный стержень γ/ε (рис. 2). Каждый интерфейс α/β формирует каталитический сайт связывания нуклеотидов, в основном образованный аминокислотными остатками β-субъединицы.

Комплекс F₀ состоит из трех основных субъединиц, называемых a, b и c. В результате олигомеризации 8–17 c-субъединиц (в зависимости от источника фермента [19]) формируется кольцевая структура, к которой примыкает мономер a-субъединицы. Помимо центрального стержня γ/ε F₁ и F₀ связаны вторым, периферическим стержнем, составленным из димера b-субъединиц и субъединицы δ [19]. Эта структура расположена рядом с a-субъединицей и латерально соединяет трансмембранный домен с вершиной гексамера αββ₃ (рис. 2). Структура F₀-F₁ эукариотических организмов сохраняет, в целом, описанный план строения, но включает несколько дополнительных субъединиц [21], номенклатура которых не всегда совпадает (подробно структура эукариотических F₀-F₁ рассмотрена в работах [19, 22]).

F₀-F₁ гидролизует АТФ посредством механизма, предложенного Бойером и известного как «вращательный механизм чередующего сродства» (rotational alternative binding site mechanism) [1], при котором каждая β-субъединица принимает одну из трех альтернативных конформаций. В первой конформации, обозначаемой как βTP, прочно связывается АТФ, во второй конформации (βDP) происходит менее прочное связывание АДФ и неорганического фосфата, а в активном центре третьей открытой конформации (βE) нуклеотид отсутствует [18]. Предполагают, что изменение конформации каталитического сайта происходит за счет энергии связывания нуклеотидов, а также в результате его взаимодействия с центральным стержнем γ/ε, вращающимся за счет энергии протонного градиента [1, 18, 23]. Таким образом, гексамер αββ₃ и субъединицы δ, a и b₂ формируют статор, относительно которого вращается ротор, состоящий из субъединиц γ/εc₁₀. На

границе между *a*- и *c*-субъединицами расположены два гидрофильных полуканала, которые в ферменте бактерий соединяют периплазматическую и цитоплазматическую стороны мембраны (рис. 2). Предполагают, что в трансмембранном переносе протонов принимает участие высоко консервативный остаток Glu (или Asp), присутствующий в каждой *c*-субъединице на внешней поверхности кольца примерно в центральной части билипидного слоя [23]. Одна из *c*-субъединиц (назовем ее для удобства первой по счету) контактирует с гидрофильным полуканалом, выходящим в периплазму, Glu/Asp в ней депротонирован и образует ионную пару с близко расположенным консервативным остатком Arg, принадлежащем субъединице *a*. При создании протонного градиента и повышении концентрации протонов в примембранном слое периплазмы карбоксильная группа Glu/Asp связывает протон, приходящий из полуканала, а Arg теряет свою ионную пару. Это приводит к перемещению Arg к протонированному остатку Glu/Asp соседней *c*-субъединицы, располагающейся вблизи второго полуканала, выходящего в цитоплазму. Близость положительного заряда пришедшей группы снижает pK_a карбоксильной группы Glu/Asp, в результате протон уходит в цитоплазму и образуется новая ионная пара с Arg, который затем возвращается в исходное положение. Вместе с ним перемещается соседняя *c*-субъединица, таким образом происходит поворот *c*-кольца в гидрофобном липидном слое и «открытие» второй *c*-субъединицы для последующего протонирования. Первая протонированная *c*-субъединица окажется в полуканале, выходящем в цитоплазму, только после поворота *c*-кольца почти на 360° , там ее карбоксильная группа депротонируется и высвобождает протон на противоположную сторону мембраны [24].

Предложенный Бойером механизм [1], был подтвержден экспериментально, и было показано, что при гидролизе АТФ происходят одновременные сдвиги в состоянии трех центров связывания нуклеотидов на β -субъединицах, которые сопровождаются механическим вращением центрального стержня γ/ϵ [25, 26]. Детальный анализ вращательного каталитического механизма бактериальной $F_0 \cdot F_1$ на примере одиночных молекул фермента *Bacillus PS3* показал, что полный поворот γ/ϵ на 360° , состоящий из трёх этапов по 120° , достигается путем гидролиза трех молекул АТФ. Каждый шаг в 120° подразделяется на два подэтапа: первый поворот на 80° обусловлен связыванием АТФ, а второй 40° – гидролизом связанного АТФ [27]. Подэтапы каталитических циклов могут различаться у разных организмов [25, 28]. При гидролизе АТФ центральный стержень вращается против часовой стрелки (CCW), если смотреть от мембранного домена на F_1 [25]. Предполагают, что при окислительном фосфорилировании *c*-кольцо $F_0 \cdot F_1$ вращается по часовой стрелке (CW), расходуя созданную дыхательной цепью *pmf* [29].

III. РЕГУЛЯЦИЯ $F_0 \cdot F_1$; ADP(Mg^{2+})-ИНГИБИРОВАНИЕ И ПРИРОДНЫЕ БЕЛКИ-ИНГИБИТОРЫ

Практически общепризнано, что $F_0 \cdot F_1$ – обратимо функционирующий комплекс, катализирующий либо гидролиз АТФ, сопряженный с векторным переносом протонов через мембрану, либо синтез АТФ, использующий свободную энергию такого переноса в прямой реакции, а направление процесса определяется вращением γ -субъединицы [25, 29]. При коллапсе дыхательной цепи, например, при ишемии или анаэробнозе, комплекс $F_0 \cdot F_1$ будет гидролизовать АТФ для восстановления *pmf*, и возникает проблема бесполезного расхода синтезированного клеточного АТФ. Для бактериальных и митохондриальных $F_0 \cdot F_1$ описаны два основных механизма торможения АТФазной активности в

деэнергизованных условиях (т.е. в отсутствие *pmf*): ADP(Mg²⁺)-ингибирование и ингибирование, опосредованное природными белками-ингибиторами.

ADP(Mg²⁺)-ингибирование представляет собой давно известный [30] и интенсивно изучаемый универсальный механизм регуляции F₀:F₁, обнаруженный во всех бактериальных [31, 32] и эукариотических формах фермента [33–35]. Преинкубация изолированного F₁ или F₀:F₁ в составе мембран в присутствии ионов Mg²⁺ и очень низких концентраций ADP приводит к полному исчезновению АТФ-гидролазной активности [30]. Удаление ADP и Mg²⁺ обработкой препаратов F₀:F₁ пируваткиназой в присутствии фосфоенолпирувата и ЭДТА активизирует фермент [36]. Неорганический фосфат (P_i) [37] и ряд других анионов, особенно эффективны сульфит [33] и селенит [38], препятствуют ингибированию. Кроме этого, повысить или выявить латентную АТФ-гидролитическую активность, ослабив ADP(Mg²⁺)-ингибирование, можно добавлением детергента лаурилдиметиламинооксида (LDAO) [39, 40]. Азид стабилизирует ADP(Mg²⁺)-ингибирование АТРазной активности и предотвращает активацию фермента [33, 41]. Эффекты перечисленных соединений служат критерием того, что торможение АТРазной активности в рассматриваемых случаях обусловлено ADP(Mg²⁺)-ингибированием.

По современным представлениям, ADP(Mg²⁺)-ингибирование возникает в результате специфического связывания ADP в каталитическом сайте (обязательно в присутствии Mg²⁺, но без P_i) [40–43]. Показано, что степень ингибирования гидролитической активности коррелирует с заполненностью каталитических сайтов ADP(Mg²⁺): для бактерий *Caldalkalibacillus thermarum* и *Mycobacterium smegmatis* с сильно заторможенной АТРазной активностью показано полное заполнение, а для фермента с неполным ингибированием из *Fusobacterium nucleatum* – частичное [14]. Опыты с одиночными молекулами F₁ *Bacillus* PS3, показали, что ADP(Mg²⁺)-ингибирование останавливало вращательный катализ на угле поворота, соответствующего каталитической остановке, и для активации требовалось дополнительное вращение на 40° в направлении гидролиза АТФ путем механического воздействия или путем термической флуктуации [44]. Считается, что соединения, стимулирующие латентную активность F₁-АТРаза, высвобождают ADP из каталитического сайта [33, 38–40]. Хотя ингибирование ADP(Mg²⁺) повсеместно распространено во всех F₀:F₁, его механизм плохо изучен. В частности, известно, что для организмов из разных источников, степень ингибирования значительно варьирует: ADP(Mg²⁺) значительной степени (~на 90%) подавляет АТФ-гидролазную активность F₁ *B. subtilis* в [45, 46], но снижает скорость гидролиза АТФ другими F₀:F₁ только на 30–50% [33].

Второй механизм, предотвращающий «расточительный» гидролиз АТФ в бактериях и митохондриях, реализуется с помощью природных белков-ингибиторов: субъединицы ε у ряда бактерий [3, 47] и IF1 в митохондриях [48].

Субъединица ε имеет структуру β-сэндвича на N-конце и α-спиральную шпильку на С-конце. N-концевой глобулярный домен соединяет γ и с-кольцо, реализуя основную функцию ε-субъединицы – структурное соединение F₁ и F₀. Однако, помимо своей связывающей функции, у некоторых бактерий ε также действует как внутренний ингибитор F₁-АТРаза [3, 49]. Ее ингибирующий домен формируется с участием двух С-концевых α-спиралей. ε-Субъединица может претерпевать значительные структурные изменения, принимая или компактную, или развернутую конформацию. В компактной конформации ингибирующего С-концевого домена две α-спирали сжимаются в антипараллельную шпильку, которая взаимодействует с неингибирующим N-концевым доменом. В такой сжатой конформации ε допускает свободное вращение γ. При переходе ε из компактной

формы в развернутую, С-конец достигает статорных (α/β) и роторной (γ) субъединиц фермента, встраивается в интерфейс $\alpha\text{DP}/\beta\text{DP}/\gamma F_1$ и ингибирует вращение центрального стержня [49–51]. Подробный анализ структуры и конформационных изменений ϵ -субъединицы приведен в работе Чинголани и Дункана [50].

В митохондриях эукариот δ -субъединица, гомологичная регуляторной субъединице ϵ бактерий, не обладает способностью ингибировать активность АТФазы. Функцию регуляторной субъединицы в $F_0:F_1$ выполняет IF1 [48]. IF1 – это белок массой ~ 10 кДа, структура которого сильно отличается от бактериальной ϵ субъединицы: он не содержит какой-либо β -складчатой структуры, а в изолированной форме представляет собой одиночную α -спираль. Полноразмерный IF1 в митохондриях сердца быка образует гомодимерный комплекс, в котором спиральную структуру для димеризации обеспечивает С-концевая область IF1. Длинная α -спиральная структура в средней части IF1 связывается с интерфейсом пары $\alpha\text{DP}/\beta\text{DP}$, тогда как короткая спираль N-конца контактирует с γ -субъединицей центрального стержня, в результате блокируются конформационные изменения β -субъединицы, необходимые для катализа [52].

Оба механизма, предотвращающие бесполезное расходование АТФ, $-\text{ADP}(\text{Mg}^{2+})$ -ингибирование и белки-ингибиторы – находятся под контролем ряда факторов, таких как изменение соотношения ADP/ATP , величины рН и *pmf*, способствующих вращению $F_0:F_1$ в направлении гидролиза.

Было обнаружено, что ϵ у некоторых бактерий содержит сайт связывания нуклеотида [53]. Связывание АТФ контролирует конформационное состояние субъединицы ϵ : при относительно высокой концентрации внутриклеточного АТФ ϵ связывается с молекулой АТФ и ее компактная структура стабилизируется, не препятствуя вращению F_1 -АТФазы в направлении гидролиза [54, 55]. При относительно низкой внутриклеточной концентрации АТФ, субъединица ϵ принимает развернутую конформацию и, контактируя с субъединицей γ , тормозит гидролиз [3, 12].

Для некоторых бактериальных $F_0:F_1$ было показано, что аффинность связывания АТФ с субъединицей ϵ повышается в несколько раз при изменении рН от 7,0 до 8,5 [55]. У млекопитающих ингибирующий белок IF1 также регулирует скорость гидролиза АТФ рН-зависимым образом [56]: при повышении рН димеры IF1 объединяются в неактивные тетрамеры [57].

Хорошо известно, что помимо соотношения ADP/ATP и изменения рН, механизм торможения гидролиза регулируется протонным потенциалом. Активация гидролиза АТФ *pmf* – это удивительное явление, поскольку *термодинамически pmf* должен препятствовать протеканию обратной реакции. В настоящее время установлено, что энергизация сопрягающих мембран приводит к быстрой активации $\text{ADP}(\text{Mg}^{2+})$ -ингибированной гидролитической активности $F_0:F_1$ практически во всех исследованных организмах. Предполагают, что *pmf* вызывает значительные конформационные изменения в структуре фермента, снижает сродство фермента к ингибирующему $\text{ADP}(\text{Mg}^{2+})$ и способствует его высвобождению из каталитического сайта [58–60].

В ряде работ были получены указания на то, что *pmf* вовлечен в регуляцию ингибирующего действия ϵ [51, 61] и IF1 [62, 63]. Полагают, что *pmf* вызывает конформационные изменения, способствующие высвобождению ингибирующего С-конца ϵ -субъединицы [52], а также диссоциацию IF1 из митохондриальной $F_0:F_1$ [62, 63].

Особое свойство всех описанных выше механизмов торможения заключается в том, что они обеспечивают *однонаправленное* торможение гидролитической актив-

ности ферментного комплекса. Белковый ингибитор IF1 не оказывает никакого влияния на синтез АТФ и функционирует как избирательный ингибитор АТРазной активности F₀·F₁ [48, 63, 64]. Эффект ADP(Mg²⁺) также проявляется однонаправленно: в субмитохондриальных частицах (СМЧ) F₀·F₁, свободная от IF1, не гидролизует АТФ в результате ADP(Mg²⁺)-торможения, но полноценно катализирует синтез АТФ [65]. Эксперименты по кросс-сшиванию С-концевого домена развернутой ε также показали, что фермент ингибируется в направлении гидролиза АТФ, однако полностью функционален в синтезе АТФ [50]. Явление однонаправленного ингибирования было показано еще в 70-х годах для F₀·F₁ тилакоидной мембраны хлоропластов [66], а затем для митохондриального [65] и бактериального ферментов [7, 9, 49]. Таким образом, избирательное торможение гидролиза АТФ – универсальное свойство всех известных F₀·F₁.

Нужно отметить, что большинство данных о регуляции F₀·F₁ было получено при изучении АТФ-гидролазной активности F₁ или F₀·F₁ в составе несопряженных мембран, не способных поддерживать мембранный потенциал. Исследование одностороннего действия регуляторов окислительного фосфорилирования и роли *pmf* в регуляции F₀·F₁ потребовало введения в практику препаратов, способных катализировать протекание реакции в обоих направлениях. Таким объектом оказался F₀·F₁ в составе суббактериальных частиц почвенной бактерии *P. denitrificans* (PdF₀·F₁).

IV. *P. DENITRIFICANS* – ПРИРОДНАЯ МОДЕЛЬ ОДНОНАПРАВЛЕННО ФУНКЦИОНИРУЮЩЕГО F₀·F₁

Давно известно, что F₀·F₁ в *P. denitrificans* [4], а также в ряде других микроорганизмов [5, 67], в частности, в микобактериях [6, 7, 68]), демонстрируют высокие скорости синтеза АТФ, но практически не способны к АТФ-зависимой транслокации протонов из-за низкой или латентной активности гидролиза АТФ и, таким образом, представляют собой физиологически необратимые ферменты [4].

Изучение системы окислительного фосфорилирования в целых бактериальных клетках или интактных митохондриях осложнено трансмембранным (в особенности, *pmf*-зависимым) переносом метаболитов. Удобным объектом исследования энергопреобразующих ферментных комплексов служат препараты инвертированных (вывернутых) мембран: субмитохондриальные или суббактериальные частицы, у которых активные центры ферментов доступны для субстратов и ингибиторов [69]. Кроме того, для катализа энергозависимых реакций мембраны таких препаратов должны сохранять способность к сопряжению, т.е. оставаться непроницаемыми для протонов, и поддерживать *pmf*, достаточную для обеспечения энергией синтеза АТФ.

Большинство широко применяемых в биоэнергетических экспериментах мембранных препаратов (например, полученные из *E. coli* [70] или из митохондрий сердца быка [71]) характеризуются высокими скоростями протонных утечек (обозначенных на рис. 1 А волнистой линией), что затрудняет или делает невозможным исследование синтеза АТФ. В настоящее время в качестве наиболее подходящего объекта для исследования регуляции F₀·F₁ рассматривают ферментный комплекс в составе мембран почвенной бактерии *P. denitrificans*. *P. denitrificans* давно привлекал внимание исследователей-биоэнергетиков [72], поскольку достаточно простые приемы позволяют получить из этого микроорганизма прочносопряженные замкнутые мембраны [73]. Протонные утечки в таких препаратах низки и сравнимы с утечками в интактных митохондриях, но значительно ниже, чем в СМЧ (около 20%, 10% и 60% соответственно) [74]. Мембраны

P. denitrificans способны поддерживать *pmf*, обеспечивающую эффективный синтез АТФ [75], что делает возможным сравнительное изучение синтеза/гидролиза АТФ и роли мембранного потенциала в регуляции $F_0 \cdot F_1$. Именно поэтому мембранные препараты *P. denitrificans* с 70-х годов остаются популярным объектом исследований [14, 72, 76]. Немаловажно, что вышеперечисленные свойства *P. denitrificans* позволяют выполнять параллельные структурные и функциональные исследования ферментов в их естественном окружении.

$PdF_0 \cdot F_1$ рассматривают как самую быструю АТФ-синтазу и самую медленную АТФазу из всех описанных: соотношение АТФ-синтазной и АТФазной активностей более чем в 100 раз выше, чем у других бактерий, таких как *E. coli*, и у митохондриального $F_0 \cdot F_1$ [8–10]. Таким образом, комплекс $PdF_0 \cdot F_1$ представляет собой наиболее эффективно контролируемый и по существу однонаправленно работающий фермент, катализирующий синтез АТФ [4].

$PdF_0 \cdot F_1$ был получен в изолированном виде, и была установлена его структура. Он имеет характерное для бактерий строение: в его структуре были обнаружены все девять субъединиц фермента: три копии α - и β -субъединиц и по одной копии каждой из γ -, δ -, ϵ - и a -субъединиц, по одной копии каждой из b - и b' -субъединиц в периферическом стержне, стехиометрия c -кольца равна 12 [77, 78]. В опытах с одиночными молекулами было показано, что в отличие от всех других $F_0 \cdot F_1$, демонстрирующих шесть или девять остановок на один оборот, $PdF_0 \cdot F_1$ при вращении делает только три остановки на 120° без промежуточных задержек. Уникальная упрощенная хемомеханическая схема $PdF_0 \cdot F_1$ в настоящее время исследуется [79, 80].

Высокая сопряженность мембранных препаратов позволила детально описать кинетику катализируемой $PdF_0 \cdot F_1$ прямой реакции энергозависимого синтеза АТФ [8, 81]. Однако исследование обратной реакции стало возможным только после открытия факторов, восстанавливающих латентную АТФазную активность фермента. Хотя традиционные приемы освобождения фермента от ADP и Mg^{2+} (инкубация с пируваткиназой и ЭДТА) не дали результата [9], гидролиз АТФ многократно активировался детергентом LDAO [10] и оксианионами, такими как сульфит [10, 82]. Кроме того, $F_0 \cdot F_1$ -АТФаза может быть значительно активирована *pmf* [9, 10]. В лаборатории А. Д. Виноградова детально исследовали гидролитическую активность препаратов $PdF_0 \cdot F_1$, способных поддерживать высокий мембранный потенциал, и обнаружили, что *pmf* нужен не только для индукции, но и для поддержания АТФ-гидролазного состояния фермента [17, 60]. Разобшение частиц (рассеивание *pmf*) приводило к падению *pmf*-активированной АТФазной активности, а ADP в низких (микромольных) концентрациях увеличивал скорость деактивации. На основании приведенных биохимических исследований (активирующий эффект LDAO, сульфита и *pmf*) заключили, что АТФазная активность регулируется ADP(Mg^{2+}). Следует отметить, что $PdF_0 \cdot F_1$ демонстрирует очень высокое сродство к ADP [60].

Субъединица ϵ в $PdF_0 \cdot F_1$ не ингибирует активность АТФазы [83]. В дополнение к 5 каноническим субъединицам бактериальных F_1 АТФаз в $PdF_0 \cdot F_1$ и родственных α -протеобактерий обнаружили новую шестую субъединицу массой 11 кДа, названную ζ (в порядке убывания размера относительно ϵ) [83]. В субъединице ζ сформирован пучок из четырех α -спиралей, направленных вниз-вверх-вниз-вверх, где $\alpha 1$ и $\alpha 3$ расположены антипараллельно, а $\alpha 2$ и $\alpha 4$ ориентированы под углами около 45° относительно двух других спиралей. N-концевой домен представляет собой протяженную α -спираль, и счи-

тают, что ее сегмент 1–19 может совершать шарнирные движения относительно бекового ядра [84]. Полностью структура субъединицы ζ, ее конформационные изменения и сравнение со структурой других белков-ингибиторов подробно рассмотрена в работе Зарко-Завалы и соавторов [11].

Было предположено, что в *P. denitrificans* ингибирующая функция переносится с субъединицы ε на ζ. Таким образом, субъединица ζ может представлять собой новый механизм регуляции бактериальной F₀:F₁ [85]. Роль ζ в ингибировании гидролитической активности PdF₁ подтвердили в опытах с вращением одиночных молекул [79]. Удаление N-концевого домена (остатки с 1 по 14) в спирали α1 устраняет подавление АТФазы [85]. Это указывает на то, что N-концевой домен ζ играет аналогичную роль в ингибировании АТФазы, что и C-концевой домен субъединицы ε эубактерий. Предполагают, что ζ-субъединица имеет сайт связывания адениновых нуклеотидов [85], и, по аналогии с ε-субъединицей, ее конформационные изменения контролирует соотношение ADP/АТФ, но надежных подтверждений этому предположению пока не получено. Анализ дыхательной цепи и фосфолипидного состава мембран показал, что *P. denitrificans* имеет самое большое сходство с митохондриями современных млекопитающих и наряду с другими α-протеобактериями филогенетически связан с протоэндосимбиотом, давшим начало митохондриям [16, 86]. Считается, что после утраты ингибирующей функции ε-субъединицы в качестве основного ингибитора F₀:F₁ АТФазы в *P. denitrificans* и других свободноживущих α-протеобактериях эволюционировала ζ [85, 87]. Вероятно, что в дальнейшем в митохондриях эндосимбиотического происхождения независимо появился IF1 [87].

V. МЕХАНИЗМ ОДНОНАПРАВЛЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ F₀:F₁ ПО ПРИНЦИПУ «ХРАПОВИК И СОБАЧКА»

Обнаружение новой субъединицы ζ в *P. denitrificans* подтолкнуло исследователей вернуться к вопросу о механизме одностороннего ингибирования F₀:F₁ и роли в нем природных белков-ингибиторов. Методами функционального и структурного моделирования этот механизм ингибирования был подробно изучен для PdF₀:F₁. Согласно этим исследованиям, ζ-субъединица входит в PdF₁ через открытый интерфейс αE/βE и прикрепляется к нему с помощью C-концевого домена. При этом высокомолекулярный N-конец ζ, исходно находившийся в разупорядоченном состоянии, взаимодействует с субъединицей γ в центральном стержне. После двух частичных поворотов γ/ε на 120° (переход в конформацию αTP/βTP в результате связывания АТФ и последующий переход в состояние αDP/βDP после гидролиза АТФ) N-конец трансформируется в длинную жесткую α-спираль, и происходит заключительная фиксация ζ в ее конечном ингибирующем положении [11]. Таким образом, N-концевая α-спираль ζ блокирует вращение γ, в то время как глобулярный домен удерживает ζ в связанном с интерфейсом αDP/βDP/γ положении [88]. Взаимодействия ζ с центральным стержнем АТФазы были подтверждены с помощью экспериментов по химическому сшиванию [85, 89].

В структуре природных белков-ингибиторов ε и IF1 также было обнаружено два функциональных домена: для прикрепления к α/β-интерфейсу F₁ и для взаимодействия с субъединицей γ. IF1 не представляет собой интегральную субъединицу PdF₁, он ингибирует фермент путем связывания-диссоциации. Первичная, вторичная и третичная структура IF1 сильно отличается от структуры бактериальных ингибирующих ε- и ζ-субъединиц, поскольку она не включает какой-либо β-складчатой структуры. Однако структурно

различные IF1 и ζ -субъединица α -протеобактерий реализуют аналогичный механизм торможения: вход \rightarrow вращение \rightarrow формирование жесткой α -спирали \rightarrow блокировка вращения [22]. Так ингибирующий N-конец IF1 входит в F_1 -АТРАЗу через открытый каталитический сайт $\alpha E/\beta E$. Затем после связывания АТФ в этом сайте комплекс субъединиц γ/ϵ претерпевает два частичных поворота против часовой стрелки на 120° , чтобы преобразовать $\alpha E/\beta E$ сначала в $\alpha TP/\beta TP$ -конформер и, наконец, после гидролиза АТФ в конформацию $\alpha DP/\beta DP$. В митохондриальном IF1 высококомобильный N-конец также переходит в жесткую α -спираль, как и в ζ . Длинная α -спиральная структура в средней части IF1 связывается с интерфейсом пары $\alpha DP/\beta DP$, тогда как короткая спираль N-конца контактирует с γ -субъединицей и блокирует дальнейшее вращение γ , что находит подтверждение в кристаллической структуре комплекса F_1 -IF1 [52]. Связывание IF1 и ζ в одном и том же ингибирующем положении на границе раздела $\alpha DP/\beta DP/\gamma$ соответствующих F_1 было подтверждено анализом функциональной конкуренции, когда оба ингибитора связывались с $\alpha DP/\beta DP/\gamma$ -интерфейсом F_1 *P. denitrificans* [87, 90].

Механизм ингибирования путем встраивания и конформационных перестроек (неупорядоченный конец \rightarrow жесткая α -спираль), описанный для N-концевой α -спирали ζ , предполагают также для ингибирующей α -спирали C-концевого домена субъединицы ϵ [49].

Таким образом, по сути, механизмы торможения гидролиза АТФ всеми тремя ингибиторами – ϵ , IF1 и ζ – схожи: они предотвращают конформационные изменения каталитических интерфейсов α/β , путем взаимодействия с γ и ингибирования вращения центрального стержня, т.е. фактически предотвращают движение ротора механическим путем. В то же самое время и субъединица ζ в $PdF_o \cdot F_1$, и субъединица ϵ и IF1 в других $F_o \cdot F_1$ АТРазах, не тормозят CW-оборот ротора при синтезе АТФ [88]. Механизм однонаправленного ингибирования гидролиза АТФ долгое время оставался невыясненным.

Чтобы объяснить избирательное действие белков-ингибиторов, предположили, что они работают по принципу храпового механизма, первоначально предложенному для ингибирующего действия бактериальной субъединицы ϵ [49]. Согласно активно обсуждаемой в настоящее время гипотезе, при гидролизе АТФ ζ -субъединица функционирует как собачка (защелка) храпового механизма («a pawl of a ratchet»), образованного субъединицей γ (рис. 3). Предполагают два способа избежать блокировки вращения γ субъединицей ζ в процессе синтеза АТФ. В первой модели (конформационная собачка-храповик) N-конец ζ может частично или полностью высвободиться в результате конформационных изменений, вызванных различными факторами, например, связыванием ADP и/или P_i во время CW-оборота АТФ-синтазы. В соответствии со второй моделью (механический храповик) субъединица ζ постоянно связана с γ , но при вращении против часовой стрелки ζ , «застывшая» в интерфейсе $\alpha DP/\beta DP$, преодолевает препятствие за счет энергии протонного градиента (*pmf*) и/или за счет энергии связывания ADP/ P_i [88, 89].

Функциональное сходство между ингибиторами ϵ , ζ и IF1 позволяет предположить, что все они могут работать как однонаправленные храповые механизмы [47, 49, 88, 91]. Так, карты криоэлектронной микроскопии подтверждают, что контакт между субъединицей ϵ и βTP блокирует вращение центрального ротора в направлении гидролиза АТФ, в то время как он все еще может свободно вращаться в направлении синтеза АТФ, что может объяснить способность субъединицы ϵ избирательно ингибировать гидролиз АТФ [91].

Оба варианта высвобождения белков-ингибиторов – конформационный и механический – были предложены недавно [11, 92], и роль энергизации мембраны и связывания

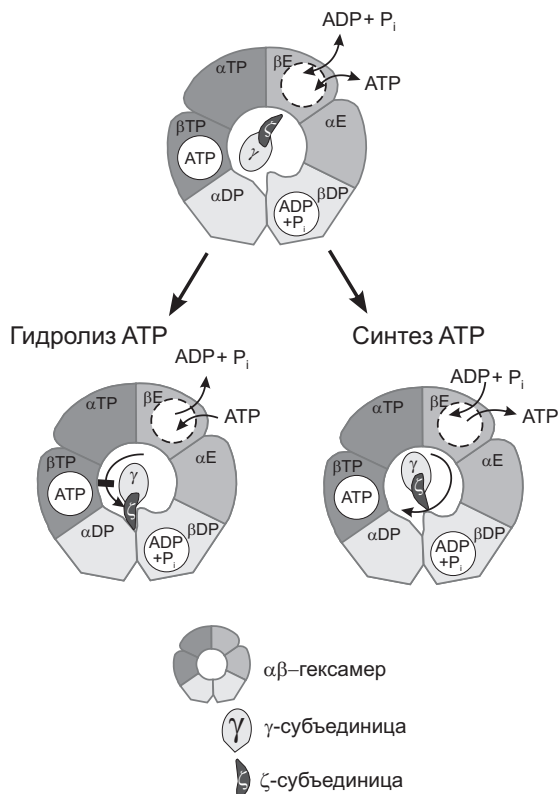


Рис. 3. Ингибирование гидролиза АТФ в F₀-F₁ *P. denitrificans* ζ-субъединицей по механизму «храповик и собачка».

F₁ *P. denitrificans* (вид сверху): гексамер α₃β₃, γ и ζ (субъединицы δ и bb' не показаны). В интерфейсе αDP/βDP образуется небольшое углубление, выполняющее роль зубца «храповика». Субъединица ζ в комплексе с субъединицей γ функционирует как защелка («собачка»). Механизм «храповика и собачки» обеспечивает свободное вращение субъединицы γ в направлении синтеза АТФ, но останавливает вращение в направлении гидролиза АТФ.

субстратов в этих моделях пока не установлена. Однако показано, что при возникновении на мембране *P. denitrificans* протонного градиента увеличивается доступность ζ для трипсина [10], что указывает на возможность *pmf*-зависимого высвобождения ζ-субъединицы. Аналогичным образом, энергизация митохондриальной мембраны увеличивала доступность IF1 для антител [93], что в обоих случаях свидетельствует в пользу конформационного механизма «храповик и собачка».

Известно, что F₀-F₁-микобактерий также не способны к АТФ-зависимой транслокации протонов из-за низкой или латентной активности гидролиза АТФ [7, 13, 68]. В их структуре была обнаружена специфическая инсерционная последовательность на С-конце α-субъединицы, которая связывается со специфической петлей субъединицы γ, и блокирует вращение в направлении против часовой стрелки [94]. Кроме того, было показано, что слитая βδ-субъединица микобактерий содержит дублированный домен в своем N-концевом участке, который взаимодействует с N-концевыми участками α-субъединицы [95]. Взаимодействие этих специфических структур микобактериальной F₀-F₁ также рассматривают как элементы механизма «храповик и собачка».

С другой стороны, в литературе накапливаются данные, противоречащие гипотезе храпового механизма. Так, например, хотя аутоингибирование С-концевым доменом ε-субъединицы (εCTD) было зарегистрировано для F₀-F₁ некоторых бактерий (*E. coli*,

Bacillus spp., *C. thermarum* TA2.A1) [54, 67], этот домен в бактериальных ферментах является наиболее вариабельным [14, 47]. Кроме того, у разных видов бактерий структуры, определенные для ϵ -субъединиц, как изолированных, так и в составе F_1 и $F_0 \cdot F_1$, показывают либо только «нижнее» (компактное) [15, 67, 96], либо только «верхнее» (развернутое) состояние ϵ CTD [91], что ставит под сомнение предполагаемые конформационные изменения ϵ -субъединицы. Так, в *F. nucleatum* [14] и *M. smegmatis* [15] ϵ -субъединица находится в нижнем положении и торможение гидролиза АТР опосредованным ϵ -субъединицей храповым механизмом не может быть реализовано [12]. Торможение гидролиза АТР с помощью ϵ -субъединицы, по-видимому, не происходит и у $PdF_0 \cdot F_1$ [88] (ϵ тоже в нижнем положении) и у других α -протеобактерий, которые используют регуляторный механизм, управляемый ζ -субъединицей [12, 85].

У некоторых организмов регуляция ϵ -субъединицы связыванием АТР также не находит подтверждения. В ранних работах на *Bacillus subtilis* было показано, что субъединица ϵ имеет сайт связывания АТР и связывание АТР вызывает конформационные переходы ϵ -субъединицы из «верхнего» ингибирующего состояния в «нижнее» состояние «шпильки» и стабилизирует его [54, 97]. Тем не менее, эта роль, вероятно, ограничена видами *Bacillus*, поскольку АТР-связывающий мотив и АТР-зависимое функционирование ϵ в целом не сохраняются у других родов бактерий [47]. В *C. thermarum* ϵ связывает АТР и находится в компактной конформации, но мутантная ϵ -субъединица *C. thermarum*, которая не связывает молекулу АТР, тем не менее, тоже сохраняет компактную конформацию [67]. ϵ -Субъединица у *M. tuberculosis* работает как регулятор активности $F_0 \cdot F_1$, но не связывает АТР [15, 96]. Следовательно, связывание АТР с ϵ в этих организмах не участвует в регуляции АТРазы.

Кроме того, в экспериментах по связыванию АТР с ϵ было обнаружено, что константа диссоциации K_d значительно отличается у разных организмов и лежит либо значительно выше (*E. coli*, $K_d = 22$ мМ [54]), либо существенно ниже (*Bacillus sp.* PS3, $K_d = 0,29$ μ М [98]) средней общей физиологической концентрации АТР в клетках, находящейся в миллимолярном диапазоне [99]. Таким образом, маловероятно, что в физиологических условиях связывание АТР может регулировать ингибиторную функцию ϵ -субъединицы [12], а ϵ -субъединица – универсальный регулятор $F_0 \cdot F_1$, так как влияние связывания АТР на ингибирующую функцию ϵ является видоспецифичной особенностью.

Появляются работы, в которых показывают, что белки-ингибиторы тормозят реакцию в обоих направлениях [5, 52, 100, 101]. Так было обнаружено, что IF1 может замедлять оборот $F_0 \cdot F_1$ АТР-синтазы в предстационарном состоянии, а также во время стационарного синтеза АТР в митохондриях [102], а ϵ , помимо блокирования обратного оборота ССW $F_0 \cdot F_1$ АТРазы, может выполнять регуляторную роль при СW-вращении $F_0 \cdot F_1$ АТР-синтазы [103].

Роль белков-ингибиторов и $ADP(Mg^{2+})$ -ингибирования в регуляции $F_0 \cdot F_1$ бактерий активно изучали с использованием мутантных вариантов регуляторных субъединиц. При генетическом удалении всего ϵ CTD у *E. coli* заметных дефектов роста в широком диапазоне условий *in vitro* не наблюдали [104], но удаление только пяти концевых остатков ϵ CTD усиливало ингибирование синтеза АТР и снижало аэробный рост *E. coli* примерно в 3 раза [103]. С помощью нокаутов роль ϵ *in vivo* оценивать трудно, поскольку ϵ является ключевой структурной субъединицей, соединяющей центральный домен γ/ϵ с c -кольцом фермента, поэтому мутация в ϵ может вызвать нарушение контакта между F_1 и F_0 и разобщение [105]. Недавно были изучены два мутанта *P. denitrificans*, лишённые

гена ζ-субъединицы. В одной работе ζ-нокаут вызывал специфический дефект роста, связанный с активацией АТФ-гидролитической активности PdF₀:F₁ [88]. Однако другие авторы показали, что ζ-нокаут не привел к явным различиям в росте бактерий и активности PdF₀:F₁ [106].

Некоторые мутации в β-субъединице F₀:F₁ *Bacillus* PS3 и *B. subtilis* заметно ослабляют ADP(Mg²⁺)-ингибирование. АТРазная активность в мембранных препаратах была в 3 раза выше у мутанта. И хотя в чистых культурах никакого влияния мутации на скорость роста *B. subtilis* не наблюдали, в экспериментах по конкурентному росту, когда дикий тип и мутантные штаммы культивировали вместе, штамм дикого типа всегда вытеснял мутант [107]. Похожие результаты были получены для митохондриальной F₀:F₁ из *Saccharomyces cerevisiae*. Мутантный штамм дрожжей имел сниженную скорость роста и более длительный лаг-период, предшествующий экспоненциальной фазе роста [108]. С другой стороны, в ряде других работ на дрожжах [109], мышцах [110] или *Caenorhabditis elegans* [111] было показано, что нокаутные мутанты митохондриального ингибитора IF1 не демонстрировали явных отличий в росте, размножении или биоэнергетике организма по сравнению с дикими типами.

Таким образом, физиологическое значение ADP(Mg²⁺)-ингибирования и природных белков-ингибиторов в регуляции F₀:F₁ все еще требует дальнейшего изучения.

Если принимать во внимание достаточно консервативную структуру ферментного комплекса, возникает вопрос о возможности однонаправленной регуляции несколькими способами в одном и том же организме. Гидролитическая активность свободной F₀:F₁ в составе СМЧ эффективно блокируется как под действием IF1, так и в результате ADP(Mg²⁺)-ингибирования [34, 56]. При исследовании механизма избирательного ингибирования гидролиза АТФ в микобактериях было обнаружено, что помимо уникального С-концевого удлинения субъединицы α, взаимодействующего со специальной петлей в γ [112], ε-субъединица с измененным, по сравнению с бактериальными и эукариотическими аналогами, аминокислотным составом N- и С-концов вносит значительный вклад в ингибирование гидролиза АТФ [113, 114]. Кроме того, предполагают, что взаимодействие α-субъединицы со слитой bδ-субъединицей [95] и связывание продуктов гидролиза, ADP и P_i, в βЕ-каталитическом сайте, вероятно, также могут быть основой ингибирования гидролиза АТФ в микобактериях [15]. Таким образом, за подавление АТРазной активности в микобактериях ответственны сразу два регуляторных механизма, но конкретный механизм регуляции ферментного комплекса не установлен.

Предполагают, что разные механизмы регуляции F₀:F₁ могут функционировать или независимо [38], или между ними возможно взаимодействие [46, 115], но этот вопрос требует экспериментального решения. Используя соединения с отчетливым активирующим действием на АТРажную активность, было показано, что ингибирование посредством εCTD и ADP(Mg²⁺)-ингибирование являются взаимоисключающими для мембраносвязанной F₀:F₁ *E. coli* [38]. С другой стороны, была показана структурная перестройка фермента, наблюдаемая при связывании ADP(Mg²⁺), и предположено, что ε-субъединица может функционировать как скобка, предотвращающая переход комплекса в состояние, ингибированное ADP(Mg²⁺) [116].

В опытах с вращением одиночных молекул подтверждена роль как ADP(Mg²⁺), так и ζ в ингибировании гидролитической активности PdF₁ [79]. В этих экспериментах наблюдали резкие изменения в среднем времени жизни состояний, обусловленных

двумя типами ингибирования, а также возможность таких молекул спонтанно восстанавливать способность гидролизовать АТФ. В то время как ингибирование $ADP(Mg^{2+})$ продолжалось в среднем около 30 с, а его ингибирующее действие спонтанно снималось, ингибирование, опосредованное ζ -субъединицей, длилось более 500 с и самопроизвольно не исчезало. Авторы считают, что $ADP(Mg^{2+})$ только модулирует активность PdF_1 -АТФазы, тогда как ζ -субъединица полностью блокирует вращение фермента в гидролитическом направлении [79]. С другой стороны, в двойных мутантах PdF_1 АТФазы, лишенных как ϵ STD, так и субъединицы ζ , не наблюдали существенной активации гидролиза АТФ [106]. Дискуссия о том, блокируется ли обратная реакция у *P. denitrificans* ζ -субъединицей [88] или, как предполагалось ранее, доминирующее влияние на латентный гидролиз АТФ оказывает $ADP(Mg^{2+})$ [60], в настоящее время продолжается [106, 115].

С другой стороны, для *C. thermarum* было показано, что ни γ -субъединица, ни регуляторный АТФ, связанный с ϵ -субъединицей, не участвуют в механизме ингибирования, а АТФазная активность тормозится продуктами гидролиза, связанными с каталитической субъединицей [67].

В настоящее время можно утверждать, что избирательное торможение гидролиза накопленного АТФ – явление универсальное, но механизмы его осуществления разнообразны и видоспецифичны, и, кроме того, в одном организме могут реализоваться несколько способов однонаправленного торможения АТФазной активности. Таким образом, многообещающая гипотеза механического торможения $F_0:F_1$ белками-ингибиторами по механизму «храповика и собачки» [22] не дает полного объяснения всей совокупности данных по однонаправленной регуляции гидролитической активности $F_0:F_1$.

VI. ГИПОТЕЗА О ДВУХ ФОРМАХ $F_0:F_1$

Помимо природных белков-ингибиторов $F_0:F_1$ в литературе давно известны низкомолекулярные «односторонние» ингибиторы, различающие фермент в режиме синтеза или в режиме гидролиза АТФ (табл.). Также было обнаружено, что остаточная АТФ-синтазная активность F_1 , модифицированного дициклогексилкарбодиимидом, после реконструкции в СМЧ была заметно выше олигомицин-чувствительной АТФазы [117]. В липосомах, содержащих $F_0:F_1$ и бактериородопсин, трифенилтин ингибировал гидролиз АТФ в большей степени, чем синтез АТФ [118].

Объяснение действия этих веществ в рамках механизма «храповика и собачки» [11, 49, 88] требует более сложных схем, поскольку низкомолекулярные соединения сами не способны механически предотвращать движение ротора. В частности, в соответствии с этим механизмом, реализующимся в гидрофильной части фермента, сложно объяснить значительную разницу в эффективности гидрофобного ингибитора вентурицидина [8, 124], по-разному влияющего на синтез и гидролиз АТФ и связывающегося с мембранными структурами фермента [127].

Разная чувствительность синтеза и гидролиза АТФ к ингибиторам и активаторам привела к представлению о механизме окислительного фосфорилирования, основанном на различиях в каталитических путях прямой и обратной реакции [128, 129]. В общем виде эта гипотеза, объясняющая одностороннее действие ряда соединений, была сформулирована в 80-х годах проф. Виноградовым: существует контролируемое рядом параметров равновесие между двумя формами $F_0:F_1$, катализирующими либо гидролиз, либо синтез АТФ [128]. Высокосопряженные мембранные препараты $PdF_0:F_1$ оказались идеальным объектом для развития этой модели и в серии работ, выполненных в лабора-

Таблица. «Односторонние» ингибиторы F₀:F₁

Соединение	Направление реакции		Ссылки
	Синтез АТФ	Гидролиз АТФ	
Ауровергин	Не влияет	Ингибирует	[119–121]
Кверцитин	Не влияет	Ингибирует	[121, 122]
Цитриоверидин	Ингибирует	Не влияет	[121]
Спегацинин	Ингибирует	Не влияет	[123]
Вентурицидин	Ингибирует, $K_i = 0,8 \times 10^{-6}$ М	Ингибирует, $K_i = 6,0 \times 10^{-6}$ М	[8, 124, 125]
Азид + ADP(Mg ²⁺)	Не влияет	Ингибирует	[65, 126]
Сульфит	Ингибирует	Активирует	[82]

тории Виноградова, было проведено детальное исследование окислительного фосфорилирования [81] и гидролиза АТФ [9, 60, 130, 131], катализируемого этим объектом. Мы показали, что исходно латентная АТРазная активность PdF₀:F₁ восстанавливается под действием потенциала [9]. Давно известно, что P_i – естественный субстрат окислительного фосфорилирования – не ингибирует гидролиз АТФ в СМЧ в концентрациях, многократно превышающих величины K_m в реакции синтеза АТФ [128]. Оказалось, что неорганический фосфат поддерживает стационарный активированный потенциалом гидролиз АТФ в препаратах PdF₀:F₁ [9, 60, 130]. Таким образом, были найденные условия активации и поддержания латентной АТРазной активности PdF₀:F₁ позволили провести сравнительное исследование реакций синтеза и гидролиза АТФ F₀:F₁.

Вентурицидин – специфический ингибитор, который взаимодействует с *c*-субъединицей F₀-домена и блокирует перенос протонов [127]. Обнаруженное ранее сильное различие в чувствительности к вентурицидину окислительного фосфорилирования и обратной реакции, катализируемых PdF₀:F₁, объясняли возможным влиянием *pmf*, повышающей сродство F₀:F₁ к вентурицидину [8, 132]. Однако позднее было показано, что, напротив, ингибитор предпочтительно связывается с неактивными молекулами фермента или с комплексом в составе разобщенных мембран [10]. Мы исследовали влияние вентурицидина на синтез и гидролиз АТФ PdF₀:F₁ при постоянной генерации *pmf* на мембране и показали, что энергизация мембраны не влияет на сродство F₀:F₁ к ингибитору. Мы обнаружили значительные различия в кинетике взаимодействия вентурицидина с F₀:F₁ для прямой и обратной реакции: зависимость остаточной АТФ-синтазной активности от концентрации ингибитора была линейной, а при гидролизе АТФ эта зависимость была сигмоидальной (в области низких концентраций ингибитора значительное торможение синтеза АТФ вентурицидином не сопровождалось падением скорости гидролиза) [125].

Была обнаружена существенная разница в рН-профиле синтеза и гидролиза АТФ: снижение рН с 8,0 до 7,0 приводило к обратимому ингибированию гидролитической активности, тогда как активность синтеза АТФ не менялась, из чего следовало, что рН контролирует гидролитическую/синтетическую активность фермента также однонаправленно [124].

Кроме того, мы показали, что на концентрацию ADP, определяемую после завершения фосфорилирования (состояние 4 по Чансу), не влияют ни 10-кратное изменение P_i, ни присутствие АТФ. Более того, даже частичное ингибирование дыхания, сни-

жавшее скорость синтеза АТР, в тех же условиях не влияло на отношение АТР/АДР. Следовательно, в состоянии 4 отношение $\text{АТР/АДР} \times P_i$ не находится в равновесии с *pmf*, генерируемой дыхательной цепью, и контролируется не термодинамическими, а кинетическими параметрами [133].

Анализ этих результатов привел к гипотезе, предполагающей существование в энергопреобразующих мембранах двух отдельных *неравновесных* форм $F_o:F_1$: одной, кинетические свойства которой максимально приспособлены для *pmf*-зависимого синтеза АТР, и другой, преимущественно осуществляющей АТР-зависимую генерацию *pmf* [17] (рис. 4). Под двумя разными формами $F_o:F_1$ мы понимаем структуры, время жизни которых многократно превышает время каталитического оборота. Они могут различаться по содержанию дополнительных субъединиц или набору специфических аннулярных фосфолипидов.

В ряде работ других лабораторий для интерпретации полученных данных исследователи также рассматривали возможность существования двух форм $F_o:F_1$.

Ген ζ -субъединицы является внешним по отношению к двум отдельным оперонам, которые координируют экспрессию субъединиц F_o и F_1 у *P. denitrificans*, *R. sphaeroides* и *R. rubrum*. Расположение гена, кодирующего ζ , вне оперонов $F_o:F_1$ у *P. denitrificans* и родственных α -протеобактерий может указывать на то, что ζ – дополнительная, неконсервативная субъединица в комплексе $F_o:F_1$, выполняющая регуляторную функцию. Экзогенно добавленная рекомбинантная ζ -субъединица способна ингибировать АТРазную активность $\text{PdF}_o:F_1$ и PdF_1 , выделенных в их нативной форме, т.е. содержащих эндогенно экспрессируемую ζ -субъединицу. Следовательно, существует часть ферментов, содержащих ζ -субъединицу и не катализирующих гидролиз АТР, а другая фракция активна как АТРаза из-за отсутствия ζ [83]. После реконструкции ζ в $\Delta\zeta \text{PdF}_o:F_1$, не удавалось получить более чем 80%-ное ингибирование [11], что также указывает на существование двух фракций, различающихся по чувствительности к ингибитору.

При выделении $\text{PdF}_o:F_1$ для рентгеноструктурного анализа ферментный комплекс элюировали с колонки Q NiTrap двумя отдельными пиками в сравнимом количестве, которые обозначили как F_1 -АТРазы I и II. Хотя обе фракции содержали фермент одинакового состава – девять основных субъединиц ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, b, b', a$ и c) плюс ζ , но кристаллы формировались только из F_1 -АТРаза I. Оказалось, что эти формы отличались по способности удерживать нативные липиды бактериальной мембраны [77].

Сравнивая активирующие эффекты сульфита и *pmf* на латентную АТРазную активность *P. denitrificans* было предположено, что как *pmf*, так и оксианионы активируют различные ингибированные состояния, присутствующие в популяции $F_o:F_1$ [82].

На бактериальных $F_o:F_1$ (*Rb. capsulatus* и *E. coli*) было показано, что коэффициент сопряжения $H^+/\text{АТР}$ (число векторно перенесенных протонов на число гидролизованных молекул), зависит от концентрации АДР: уменьшение концентрации АДР при постоянной концентрации АТР сопровождалось снижением $H^+/\text{АТР}$. Для объяснения этих данных было введено представление о двух взаимопревращаемых состояниях $F_o:F_1$, различающихся своими коэффициентами сопряжения, причем состояние с высоким коэффициентом способствовало связыванию АДР, а с низким – связыванию АТР [134].

Субъединица ϵ не вызывает полное ингибирование АТРазной активности [3, 105]. Этот результат интерпретировали как существование двух форм фермента, одна из которых не ингибируется ϵ [105]. Кроме того, в некоторых условиях ϵ -субъединица в *Bacillus* spp. вызывала активацию, а не ингибирование гидролиза АТР [5, 103].

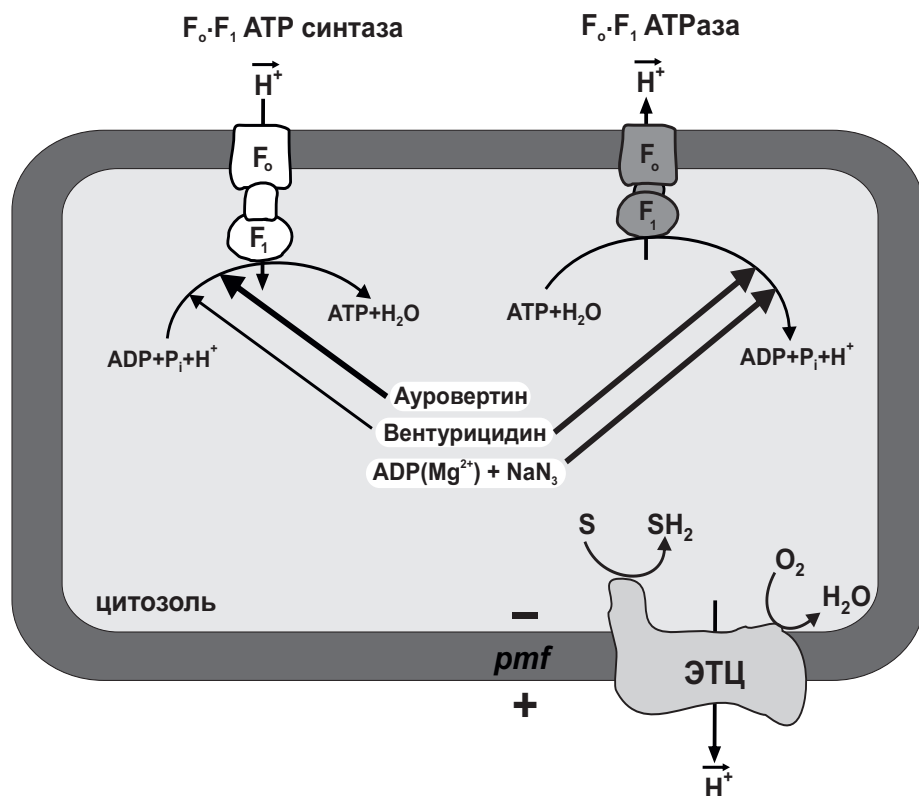


Рис. 4. Две формы F₀:F₁ и «односторонние» ингибиторы фермента.

Сопрягающая мембрана бактериальной клетки содержит две формы F₀:F₁: АТФ-синтазу и АТФ-гидролазу, различающиеся по чувствительности к ингибиторам. «Односторонние» ингибиторы по-разному действуют на АТФ-синтазу и АТФ-гидролазу. Толщина стрелок соответствует эффективности ингибиторов фермента. Толстые стрелки указывают на высокое сродство фермента к ингибитору.

Хотя АТФазная активность мутантов *P. denitrificans*, лишенных ϵ и ζ , заметно повышалась, полностью фермент активировался только в присутствии сульфита или LDAO [88], или под действием *pmf*. Считают, что перечисленные воздействия снимают ингибирование ADP(Mg²⁺) [115]. При исследовании нескольких форм регуляции F₀:F₁ в *E. coli*, опосредованной ϵ и ADP(Mg²⁺)-торможением, для объяснения полученных данных также привлекали гипотезу о двух состояниях фермента [38]. Взаимоотношения между тремя способами регулирования активности F₀:F₁ в *P. denitrificans* ζ -субъединицей, ADP(Mg²⁺)-ингибированием и *pmf* также были объяснены в рамках этой гипотезы. Было предположено, что первые два типа воздействия изменяют распределение состояний фермента, увеличивая долю PdF₀:F₁, восприимчивого к активации с помощью *pmf* [115]. Таким образом, наблюдаемое многообразие регуляторных элементов в одном организме (ϵ , ζ , ADP(Mg²⁺) и *pmf*) можно объяснить одновременным существованием нескольких форм ферментного комплекса с различными типами регуляции.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

$\text{PdF}_o\cdot\text{F}_1$ в составе прочносопряженных мембранных препаратов, позволяющих проводить исследования как АТРазной, так и АТР-синтазной активностей, оказался полезной моделью для изучения механизма однонаправленного катализа. Открытие новой регуляторной субъединицы и подробные исследования ранее известных форм регуляции фермента привели к представлению о сложном контроле окислительного фосфорилирования, зависимом как от белка-ингибитора ζ , так и от $\text{ADP}(\text{Mg}^{2+})$. Дальнейшие исследования $\text{PdF}_o\cdot\text{F}_1$ позволят ответить на вопрос, каким образом реализуется режим однонаправленной работы – по механизму «храповик и собачка» и/или как результат активности двух форм $\text{F}_o\cdot\text{F}_1$. Кроме того, этот объект позволит установить факторы, запускающие механизмы регуляции: соотношение ADP/ATP , pH и, главным образом, *pmf*. Таким образом, $\text{PdF}_o\cdot\text{F}_1$ – перспективный объект исследований, позволяющий использовать новые подходы к нерешенным проблемам регуляции синтеза/гидролиза АТР.

$\text{PdF}_o\cdot\text{F}_1$ в составе прочносопряженных мембран может служить моделью для поиска лекарственных препаратов. Развитие современных методов, таких как рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия, позволили вывести поиск молекул, взаимодействующих с $\text{F}_o\cdot\text{F}_1$ в важных для биомедицины формах фермента, на новый прогрессивный уровень [135]. Однако точности определения мешает высокая подвижность комплекса, и не все его формы могут быть выявлены этими методами. Кроме того, в зависимости от условий роста могут проявляться разные механизмы регуляции бактериальных $\text{F}_o\cdot\text{F}_1$. Так, недавно, было показано, что вентурицидин А потенцирует действие аминогликозидных антибиотиков против различных бактериальных патогенов [136]. Предполагают, что эффект вентурицидина связан с функциональным разобщением F_1 и F_o , индуцируемым ингибитором [137].

Как описано в настоящем обзоре, $\text{F}_o\cdot\text{F}_1$ многих бактерий, среди которых есть патогенные микроорганизмы, например, микобактерии, характеризуются однонаправленной работой ферментного комплекса [7, 67], и их латентная АТРазная активность подобно $\text{PdF}_o\cdot\text{F}_1$ активируется *pmf* [7]. Мы считаем, что наша гипотеза о существовании двух форм будет полезна не только для установления механизмов регуляции $\text{F}_o\cdot\text{F}_1$, но и для поиска мишеней для лекарственных средств в таких ферментах. Кроме того, нужно помнить, что структурные исследования пока не могут учитывать роль *pmf* во взаимодействии фермента с молекулами лекарств, так как их проводят на изолированных препаратах в отсутствие полноценной мембраны. Мы считаем, что важно исследовать фермент в энергизованном состоянии, поскольку *pmf* может влиять на конформационную подвижность комплекса. Таким образом, не только знание детальной структуры $\text{F}_o\cdot\text{F}_1$ патогенов, но и понимание их механизмов и способов регуляции, основанное на традиционных биохимических экспериментах [138], могут обеспечить рациональный подход к разработке новых лекарственных средств.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА

1. Boyer, P.D. (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine, *Annual Review of Biochemistry*, **66**, 717–749.
2. Walker, J.E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochemical Society Transactions*, **41**, 1–16.
3. Krah, A. (2015) Linking structural features from mitochondrial and bacterial F-type ATP synthases to their distinct mechanisms of ATPase inhibition, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **119**, 94–102.
4. Ferguson, S.J., John, P., Lloyd, W.J., Radda, G.K., Whatley, F.R. (1976) The ATPase as an irreversible component in electron transport linked ATP synthesis, *FEBS Letters*, **62**, 272–275.
5. Cook, G.M., Keis, S., Morgan, H.W., von Ballmoos, C., Matthey, U., Kaim, G., Dimroth, P. (2003) Purification and biochemical characterization of the F1Fo-ATP synthase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TA2.A1. *Journal of Bacteriology*, **185**, 4442–4449.
6. Higashi, T., Kalra, V.K., Lee, S.H., Bogin, E., Brodie, A.F. (1975) Energy-transducing membrane-bound coupling factor-ATPase from *Mycobacterium phlei*. I. Purification, homogeneity, and properties, *Journal of Biological Chemistry*, **250**, 6541–6548.
7. Haagsma, A.C., Driessen, N.N., Hahn, M.M., Lill, H., Bald, D. (2010) ATP synthase in slow- and fast-growing mycobacteria is active in ATP synthesis and blocked in ATP hydrolysis direction, *FEMS Microbiology Letters*, **313**, 68–74.
8. Perez, J.A., Ferguson, S.J. (1990) Kinetics of oxidative phosphorylation in *Paracoccus denitrificans*. 1. Mechanism of ATP synthesis at the active site(s) of F0F1-ATPase, *Biochemistry*, **29**, 10503–10518.
9. Жарова Т.В., Виноградов А.Д. (2003) Протонтранслоцирующая АТРсинтаза *Paracoccus denitrificans*: АТР гидролазная активность, *Биохимия*, **68**, 1370–1380.
10. Pacheco-Moises, F., García, J.J., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R. (2000) Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* F0F1-ATPase, *European Journal of Biochemistry*, **267**, 993–1000.
11. Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., García-Trejo, J.J. (2018) Unidirectional regulation of the F1Fo-ATP synthase nanomotor by the ζ pawl-ratchet inhibitor protein of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1859**, 762–774.
12. Krah, A., Zarco-Zaval, M., McMillan, D.G.G. (2018) Insights into the regulatory function of the epsilon subunit from bacterial F-type ATP synthases: a comparison of structural, biochemical and biophysical data, *Open Biology*, **8**, 170275.
13. Cook, G.M., Greening, C., Hards, K., Berney, M. (2014) Energetics of pathogenic bacteria and opportunities for drug development, *Advances in Microbial Physiology*, **65**, 1–62.
14. Petri, J., Nakatani, Y., Montgomery, M.G., Ferguson, S.A., Aragão, D., Leslie, A.G.W, Heikal, A., Walker, J.E., Cook, G.M. (2019) Structure of F₁-ATPase from the obligate anaerobe *Fusobacterium nucleatum*, *Open Biology*, **9**, 190066.
15. Zhang, A.T., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Cook, G.M., Walker, J.E. (2019) The structure of the catalytic domain of the ATP synthase from *Mycobacterium smegmatis* is a target for developing antitubercular drugs, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **116**, 4206–4211.
16. Ferguson, S.J. (2018) *Paracoccus denitrificans* Oxidative Phosphorylation: Retentions, Gains, Losses, and Lessons En Route to Mitochondria, *IUBMB Life, European Journal of Biochemistry*, **70**, 1214–1221.
17. Виноградов А.Д. (2019) Новый взгляд на проблему обратимости синтеза и гидролиза АТФ_o·F₁-АТРазой (гидролазой), *Биохимия*, **84**, 1553–1563.
18. Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature*, **370**, 621–628.

19. Kühlbrandt, W. (2019) Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annual Review of Biochemistry*, **88**, 515–549.
20. Courbon, G.M., Rubinstein, J.L. (2022) CryoEM Reveals the Complexity and Diversity of ATP Synthases, *Frontiers in Microbiology*, **13**, 864006.
21. He, J., Ford, H. C., Carroll, J., Douglas, C., Gonzales, E., Ding, S., et al. (2018) Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **115**, 2988–2993.
22. Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., García-Trejo, J.J. (2018) Control of rotation of the F₁F_o-ATP synthase nanomotor by an inhibitory α -helix from unfolded ϵ or intrinsically disordered ζ and IF1 proteins, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **50**, 403–424.
23. Fillingame, R.H., Steed, P.R. (2014) Half channels mediating H⁽⁺⁾ transport and the mechanism of gating in the F_o sector of *Escherichia coli* F₁F_o ATPsynthase, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1837**, 1063–1068.
24. Guo, H., Bueler, S.A., Rubinstein, J.L. (2017) Atomic model for the dimeric F_o region of mitochondrial ATP synthase, *Science*, **358**, 936–940.
25. Noji, H., Ueno, H. (2022) How Does F₁-ATPase Generate Torque?: Analysis From Cryo-Electron Microscopy and Rotational Catalysis of Thermophilic F₁, *Frontiers in Microbiology*, **13**, 904084.
26. Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita Jr., K. (1997) Direct observation of the rotation of F₁-ATPase, *Nature*, **386**, 299–302.
27. Noji, H., Ueno, H., McMillan, D.G.G. (2017) Catalytic robustness and torque generation of the F₁-ATPase, *Biophysical Reviews*, **9**, 103–118.
28. Suzuki, T., Tanaka, K., Wakabayashi, C. Saita, E., Yoshida, M. (2014) Chemomechanical coupling of human mitochondrial F₁-ATPase motor, *Nature Chemical Biology*, **10**, 930–936.
29. Rondelez, Y., Tresset, G., Nakashima, T., Kato-Yamada, Y., Fujita, H., Takeuchi, S., Noji, H. (2005) Highly coupled ATP synthesis by F₁-ATPase single molecules, *Nature*, **433**, 773–777.
30. Fitin, A.F., Vasilyeva, E.A., Vinogradov A.D. (1979) An inhibitory high affinity binding site for ADP in the oligomycin-sensitive ATPase of beef heart submitochondrial particles, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **86**, 434–349.
31. Hyndman, D.J., Milgrom, Y.M., Bramhall, E.A., Cross, R.L. (1994). Nucleotide binding sites on *Escherichia coli* F₁-ATPase. Specificity of noncatalytic sites and inhibition at catalytic sites by MgADP, *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 28871–28877.
32. Лапашина А.С., Фенюк Б.А. (2018) АДФ-ингибирование H⁺-F₀F₁-АТФ синтазы, *Биохимия*, **83**, 1427–1449.
33. Vasilyeva, E.A., Minkov, I.B., Fitin, A.F., Vinogradov, A.D. (1982) Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite, *The Biochemical Journal*, **202**, 15–23.
34. Zhou, J.M., Xue, Z.X., Du, Z.Y., Melese, T., Boyer, P.D. (1988) Relationship of tightly bound ADP and ATP to control and catalysis by chloroplast ATP synthase, *Biochemistry*, **27**, 5129–5135.
35. Vinogradov, A.D. (2000) Steady-state and pre-steady-state kinetics of the mitochondrial F(1)F(o) ATPase: is ATP synthase a reversible molecular machine? *Journal of Experimental Biology*, **203**, 41–49.
36. Vasilyeva, E.A., Fitin, A.F., Minkov, I.B., Vinogradov, A.D. (1980) Kinetics of interaction of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate with ATPase of bovine heart submitochondrial particles, *The Biochemical Journal*, **188**, 807–815.
37. Yalamova, M.V., Vasilyeva, E.A., Vinogradov, A.D. (1982) Mutually dependent influence of ADP and P_i on the activity of mitichondrial adenosine triphosphatase, *Biochemistry international*, **4**, 337–344.

38. Milgrom, Y.M., Duncan, T.M. (2020) F-ATP-ase of *Escherichia coli* membranes: The ubiquitous MgADP-inhibited state and the inhibited state induced by the ϵ -subunit's C-terminal domain are mutually exclusive, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1861**, 148189.
39. Paik, S.R., Jault, J.M., Allison, W.S. (1994) Inhibition and inactivation of the F1 adenosine-triphosphatase from *Bacillus PS3* by dequalinium and activation of the enzyme by lauryl dimethylamine oxide, *Biochemistry*, **33**, 126–133.
40. Jault, J.M., Dou, C., Grodsky, N.B., Matsui, T., Yoshida, M., Allison, W.S. (1995) The alpha3beta3gamma subcomplex of the F1-ATPase from the thermophilic bacillus PS3 with the betaT165S substitution does not entrap inhibitory MgADP in a catalytic site during turnover, *Biochemistry*, **34**, 16412–16418.
41. Bowler, M.W., Montgomery, M.G., Leslie, A., Walker, J.E. (2006) How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**, 8646–8649.
42. Drobinskaya, I.Y., Kozlov, I.A., Murataliev, M.B., Vulfson, E.N. (1985) Tightly bound adenosine diphosphate, which inhibits the activity of mitochondrial F1-ATPase, is located at the catalytic site of the enzyme, *FEBS Letters*, **182**, 419–424.
43. Hirano-Hara Y., Noji H., Nishiura M., Muneyuki E., Hara K. Y., Yasuda R., Kinoshita K., Jr., Yoshida M. (2001) Pause and rotation of F(1)-ATPase during catalysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**, 13649–13654.
44. Hirano-Hara, Y., Ishizuka, K., Kinoshita, K. Jr., Yoshida, M., Noji, H. (2005) Activation of pausing F1 motor by external force, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102**, 4288–4293.
45. Ishikawa, T., Kato-Yamada, Y. (2014) Severe MgADP inhibition of *Bacillus subtilis* F1-ATPase is not due to the absence of nucleotide binding to the noncatalytic nucleotide binding sites, *PLoS One*, **9**, e107197.
46. Mizumoto, J., Kikuchi, Y., Nakanishi, Y.H., Mouri, N., Cai, A., Ohta, T., Haruyama, T., Kato-Yamada, Y. (2013) Epsilon subunit of *Bacillus subtilis* F1-ATPase relieves MgADP inhibition, *PLoS One*, **8**, e73888.
47. Sielaff, H., Duncan, T.M., Börsch, M. (2018) The regulatory subunit ϵ in *Escherichia coli* F_oF₁-ATP synthase, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1859**, 775–788.
48. Pullman, M.E., Monroy, G.C. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase, *Journal of Biological Chemistry*, **238**, 3762–3769.
49. Tsunoda, P., Rodgers, A.J., Aggeler, R., Wilce, M.C., Yoshida, M., Capaldi, R.A. (2001) Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**, 6560–6564.
50. Cingolani, G., Duncan, T.M. (2011) Structure of the ATP synthase catalytic complex (F1)) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation, *Nature Structural and Molecular Biology*, **18**, 701–707.
51. Liu, Y., Yu, J., Wang, M., Zeng, Q., Fu, X., Chang, Z. (2020) A high-throughput genetically directed protein crosslinking analysis reveals the physiological relevance of the ATP synthase 'inserted' state, *FEBS Journal*, **288**, 2989–3009.
52. Bason, J.V., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E. (2014) Pathway of binding of the intrinsically disordered mitochondrial inhibitor protein to F1-ATPase, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **111**, 11305–11310.
53. Kato-Yamada, Y., Yoshida, M. (2003) Isolated epsilon subunit of thermophilic F1-ATPase binds ATP, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 36013–36016.
54. Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., Akutsu, H. (2007) Structures of the thermophilic F1-ATPase ϵ subunit suggesting ATP regulated arm motion of its C-terminal domain in F1, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **104**, 11233–11238.

55. Krah, A., Vogelaar, T., de Jong, S.I., Claridge, J.K., Bond, P.J., McMillan, D.G.G. (2023) ATP binding by an F₁F_o ATP synthase ϵ subunit is pH dependent, suggesting a diversity of ϵ subunit functional regulation in bacteria, *Frontiers in Molecular Biosciences*, **10**, 1059673.
56. Panchenko M.V., Vinogradov A.D. (1985) Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein. Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein, *FEBS Letters*, **184**, 226–230.
57. Cabezón, E., Butler, P.J.G., Runswick, M.J., Walker, J.E. (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F₁-ATPase inhibitor protein, IF₁, by pH, *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 25460–25464.
58. Galkin, M.A., Vinogradov, A.D. (1999) Energy-dependent transformation of the catalytic activities of the mitochondrial FoF₁-ATP synthase, *FEBS Letters*, **448**, 123–126.
59. Fischer, S., Graber, P., Turina, P. (2000) The activity of the ATP synthase from *Escherichia coli* is regulated by the transmembrane proton motive force, *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 30157–30162.
60. Zharova, T.V., Vinogradov, A.D. (2004) Energy-dependent transformation of F₀F₁-ATPase in *Paracoccus denitrificans* plasma membranes, *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 12319–12324.
61. Suzuki, T., Murakami, T., Iino, R., Suzuki, J., Ono, S., Shirakihara, Y., Yoshida, M. (2003) FoF₁-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 46840–46846.
62. Klein, G., Vignais, P.V. (1983) Effect of the protonmotive force on ATP linked processes and mobilization of the bound natural ATPase inhibitor in beef heart submitochondrial particles, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **15**, 347–362.
63. Schwerzmann, K., Pedersen, P.L. (1986) Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **250**, 1–18.
64. Carroll, J., Watt, I.N., Wright, C.J., Ding, S., Fearnley, I.M., Walker, J.E. (2024) The inhibitor protein IF₁ from mammalian mitochondria inhibits ATP hydrolysis but not ATP synthesis by the ATP synthase complex, *Journal of Biological Chemistry*, **300**, 105690.
65. Syroeshkin, A.V., Vasilyeva, E.A., Vinogradov, A.D. (1995) ATPsynthesis catalyzed by the mitochondrial F₁-F₀ATPsynthase is not a reversal of its ATPase activity, *FEBS Lett.*, **366**, 29–32.
66. Hahn, A., Vonck, J., Mills, D.J., Meier, T., Kühlbrandt, W. (2018) Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase, *Science*, **360**, eaat4318.
67. Ferguson, S.A., Cook, G.M., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E. (2016) Regulation of the thermoalkaliphilic F₁-ATPase from *Caldalkalibacillus thermarum*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **113**, 10860–10865.
68. Hotra, A., Sute, M., Biuković, G., Ragunathan, P., Kundu, S., Dick, T., Grüber, G. (2016) Deletion of a unique loop in the mycobacterial F-ATP synthase gamma subunit sheds light on its inhibitory role in ATP hydrolysis driven H⁺ pumping, *FEBS Journal*, **283**, 1947–1961.
69. Futai, M. (1974) Orientation of membrane vesicles from *Escherichia coli* prepared by different procedures. *The Journal of Membrane Biology*, **15**, 15–28.
70. Burstein, C., Tiankova, L., Kepes, A. (1979) Respiratory control in *Escherichia coli* K 12, *European Journal of Biochemistry*, **94**, 387–392.
71. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. (2013) Генерация активных форм кислорода митохондриями, *Успехи биологической химии*, **53**, 245–245.
72. John, P., Whatley, F. R. (1977) Bioenergetics of *Paracoccus denitrificans*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **463**, 129–153.
73. John, P., Whatley, F.R. (1970) Oxidative phosphorylation coupled to oxygen uptake and nitrate reduction in *Micrococcus denitrificans*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **216**, 342–352.

74. Jones, A.J.Y., Blaza, J.N., Varghese, F., Hirst, J. (2017) Respiratory Complex I in *Bostaurus* and *Paracoccus denitrificans* Pumps Four Protons across the Membrane for Every NADH Oxidized, *Journal of Biological Chemistry*, **292**, 4987–4995.
75. Kell, D.B., John, P. (1978) The Protonmotive Force in Phosphorylating Membrane Vesicles from *Paracoccus denitrificans*, *The Biochemical Journal*, **174**, 257–266.
76. Covian, R., Edwards, L., He, Y., Kim, G., Houghton, C., Levine, R.L., et al. (2021) Energy homeostasis is a conserved process: Evidence from *Paracoccus denitrificans*' response to acute changes in energy demand, *PLoS One*, **16**, e0259636.
77. Morales-Ríos, E., Watt, I.N., Zhang, Q., Ding, S., Fearnley, I.M., Montgomery, M.G., Wakelam, M.J.O., Walker, J.E. (2015) Purification, characterization and crystallization of the F-ATPase from *Paracoccus denitrificans*, *Open Biology*, **5**, 150119.
78. Morales-Ríos, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E. (2015) The structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **112**, 13231–13236.
79. Zarco-Zavala, M., Watanabe, R., McMillan, D.G.G., Suzuki, T., Ueno, H., Mendoza-Hoffmann, F., García-Trejo, J.J., Noji, H. (2020) The 3×120° rotary mechanism of *Paracoccus denitrificans* F₁-ATPase is different from that of the bacterial and mitochondrial F₁-ATPases, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **117**, 29647–29657.
80. N. Suiter, S. Volkán-Kacsó (2023) Angle-dependent rotation velocity consistent with ADP release in bacterial F₁-ATPase, *Frontiers in molecular biosciences*, **10**, 1184249.
81. Кегярикова К.А., Жарова Т.В., Виноградов А.Д. (2010) Протон-транслоцирующая АТРаза *Paracoccus denitrificans*: кинетика окислительного фосфорилирования, *Биохимия*, **75**, 1424–1434.
82. Pacheco-Moises, F., Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., García, J.J. (2002) Sulfite inhibits the F1Fo-ATP synthase and activates the F1F0-ATPase of *Paracoccus denitrificans*, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **34**, 269278.
83. Morales-Ríos, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernandez, G., Rodriguez-Zavala, J.S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., Garcia-Trejo, J.J. (2010) A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F1Fo ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha proteobacteria, *FASEB Journal*, **24**, 599–608.
84. Serrano, P., Geralt, M., Mohanty, B., Wüthrich, K. (2014) NMR structures of α -proteobacterial ATPase-regulating ζ subunits, *Journal of Molecular Biology*, **426**, 2547–2553.
85. Zarco-Zavala, M., Morales-Ríos, E., Mendoza-Hernandez, G., Ramirez-Silva, L., Perez-Hernandez, G., Garcia-Trejo, J.J. (2014) The ζ subunit of the F1FO-ATP synthase of alpha-proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure, *FASEB Journal*, **28**, 2146–2157.
86. John, P., Whatley, F. R. (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of mitochondria, *Nature*, **254**, 495–498.
87. Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., Celis-Sandoval, H., Torres-Larios, A., García-Trejo, J.J. (2022) Evolution of the Inhibitory and Non-Inhibitory ϵ , ζ , and IF₁ Subunits of the F₁F₀-ATPase as Related to the Endosymbiotic Origin of Mitochondria, *Microorganisms*, **10**, 1372.
88. Mendoza-Hoffmann, F., Pérez-Oseguera, A., Cevallos, M.A., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., Peña-Segura, C., Espinoza-Simón, E., Uribe-Carvajal, S., Garcia-Trejo, J.J. (2018) The biological role of the ζ subunit as unidirectional inhibitor of the F1Fo-ATPase of *Paracoccus denitrificans*, *Cell Reports*, **22**, 1067–1078.
89. Garcia-Trejo, J.J., Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., Hernandez-Luna, E., Ortega, R., Mendoza-Hernandez, G. (2016) The inhibitory mechanism of the zeta subunit of the F1Fo-ATPase nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria, *Journal of Biological Chemistry*, **291**, 538–546.

90. Kobayashi, R., Ueno, H., Okazaki, K.-I., Noji, H. (2023) Molecular mechanism on forcible ejection of ATPase inhibitory factor 1 from mitochondrial ATP synthase, *Nature Communications*, **14**, 1682.
91. Guo, H. Suzuki, T. Rubinstein, J.L. (2019) Structure of a bacterial ATP synthase, *eLife*, **8**, e43128.
92. Miranda-Astudillo, H.; Zarco-Zavala, M.; García-Trejo, J.J.; González-Halphen, D. (2021) Regulation of bacterial ATP synthase activity: A gear-shifting or a pawl-ratchet mechanism, *FEBS Journal*, **288**, 3159–3163.
93. Dreyfus, G., Gomez-Puyou, A., de Gomez-Puyou, M.I. (1981) Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase as directed by antibodies against the inhibitor protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **100**, 400–406.
94. Wong, C. F., Saw, W.-G., Basak, S., Sano, M., Ueno, H., Kerk, H. W., et al. (2022) Structural elements involved in ATP hydrolysis inhibition and ATP synthesis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial F-ATP synthase decipher new targets for inhibitors, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **66**, e0105622.
95. Montgomery, M. G., Petri, J., Spikes, T. E., Walker, J. E. (2021) Structure of the ATP synthase from *Mycobacterium smegmatis* provides targets for treating tuberculosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **118**, e2111899118.
96. Biukovic, G., Basak, S., Manimekalai, M.S.S., Rishikesan, S., Roessle, M., Dick, T., Rao, S.P.S., Hunke, C., Grüber, G. (2013) Variations of subunit epsilon of the *Mycobacterium tuberculosis* F₁F₀ ATP synthase and a novel model for mechanism of action of the tuberculosis drug TMC207, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 168–176.
97. Akanuma, G., Tagana, T., Sawada, M., Suzuki, S., Shimada, T., Tanaka, K., Kawamura, F., Kato-Yamada Y. (2019) C-terminal regulatory domain of the ϵ subunit of F₀F₁ ATP synthase enhances the ATP-dependent H⁺ pumping that is involved in the maintenance of cellular membrane potential in *Bacillus subtilis*, *Microbiology open*, **8**, e00815.
98. Fujiwara, M., Kato-Yamada, Y. (2020) ATP-binding affinity of the ϵ subunit of thermophilic F₁-ATPase under label-free conditions, *Biochemistry and Biophysics Reports*, **21**, 100725.
99. Deng, Y., Beahm, D.R., Ionov, S., Sarpeshkar, R. (2021) Measuring and modeling energy and power consumption in living microbial cells with a synthetic ATP reporter. *BMC Biology*, **19**, 101.
100. Lippe, G., Sorgato, M.C., Harris, D.A. (1988) Kinetics of the release of the mitochondrial inhibitor protein. Correlation with synthesis and hydrolysis of ATP, *Biochimica et Biophysica Acta*, **933**, 1–11.
101. Garcia-Bermudez, J., Cuezva, J.M. (2016) The ATPase inhibitory factor 1 (IF1): a master regulator of energy metabolism and of cell survival, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1857**, 1167–1182.
102. Gómez-Puyou, A., de Gómez-Puyou, M.T., Ernster, L. (1979) Inactive to active transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor, *Biochim Biophys Acta*, **547**, 252–257.
103. Shah, N.B., Duncan, T.M. (2015) Aerobic growth of *Escherichia coli* is reduced, and ATP synthesis is selectively inhibited when five C-terminal residues are deleted from the subunit of ATP synthase, *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 21032–21041.
104. Taniguchi, N., Suzuki, T., Berney, M., Yoshida, M., Cook, G.M. (2011) The regulatory C-terminal domain of subunit ϵ of F₀F₁ ATP synthase is dispensable for growth and survival of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **193**, 2046–2052.
105. Capaldi, R.A., Schulenberg, B. (2000) The epsilon subunit of bacterial and chloroplast F(1)F(0) ATPases. Structure, arrangement, and role of the epsilon subunit in energy coupling within the complex, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1458**, 263–269.

106. Varghese, F., Blaza, J.N., Jones, A.J.Y., Jarman, O.D., Hirst, J. (2018) Deleting the IF₁-like ζ subunit from *Paracoccus denitrificans* ATP synthase is not sufficient to activate ATP hydrolysis, *Open Biology*, **8**, 170206.
107. Lapashina, A.S., Feniouk B.A. (2019) Mutation Q259L in subunit beta in *Bacillus subtilis* ATP synthase attenuates ADP-inhibition and decreases fitness in mixed cultures, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **509**, 102–107.
108. Lapashina, A.S., Kashko, N.D., Zubareva, V.M., Galkina, K.V., Markova, O.V., Knorre, D.A., Feniouk, B.A. (2022) Attenuated ADP-inhibition of F₀F₁ ATPase mitigates manifestations of mitochondrial dysfunction in yeast, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1863**, 148544.
109. Lu, Y.M., Miyazawa, K., Yamaguchi, K., Nowaki, K., Iwatsuki, H., Wakamatsu, Y., Ichikawa, N., Hashimoto, T. (2001) Deletion of mitochondrial ATPase inhibitor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* decreased cellular and mitochondrial ATP levels under non-nutritional conditions and induced a respiration-deficient cell-type, *The Journal of Biochemistry*, **130**, 873–878.
110. Nakamura, J., Fujikawa, M., Yoshida, M. (2013) IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice, *Bioscience Reports*, **33**, e00067.
111. Fernandez-Cardenas, L.P, Villanueva-Chimal, E., Salinas, L.S., Jose-Nunez, C., Tuena de Gomez Puyou, M., Navarro, R.E. (2017) *Caenorhabditis elegans* ATPase inhibitor factor 1 (IF1) MAI-2 preserves the mitochondrial membrane potential (Deltapsim) and is important to induce germ cell apoptosis, *PLoS One*, **12**, e0181984.
112. Wong, C.-F., Grüber G. (2020) The unique C-terminal extension of mycobacterial F-ATP synthase subunit α is the major contributor to its latent ATP hydrolysis activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **64**, e01568–20.
113. Joon, S., Ragunathan, P., Sundararaman, L., Nartey, W., Kundu, S., Manimekalai, M.S.S., Bogdavic, N., Dick, T., Grüber, G. (2018) The NMR solution structure of *Mycobacterium tuberculosis* F-ATP synthase subunit ϵ provides new insight into energy coupling inside the rotary engine, *FEBS Journal*, **285**, 1111–1128.
114. Bogdanović, N., Sundararaman, L., Kamariah, N., Tyagi, A., Bhushan, S., Ragunathan, P., Shin, J., Dick, T., Grüber, G. (2018) Structure and function of Mycobacterium specific components of F-ATP synthases ubunits α and ϵ , *Journal of Structural Biology*, **204**, 420–434.
115. Jarman, O.D., Biner, O., Hirst, J. (2021) Regulation of ATP hydrolysis by the ϵ subunit, ζ subunit and Mg-ADP in the ATP synthase of *Paracoccus denitrificans*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1862**, 148355.
116. Sobti, M., Walshe, J.L., Wu, D., Ishmukhametov, R., Zeng, Y.C., Robinson, C.V., et al. (2020) Cryo-EM structures provide insight into how *E. coli* F1Fo ATP synthase accommodates symmetry mismatch, *Nature Communications*, **11**, 2615.
117. Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y. (1984) Inhibitory chemical modifications of F1-ATPase: effects on the kinetics of adenosine 5'-triphosphate synthesis and hydrolysis in reconstituted systems, *Biochemistry*, **23**, 3508–3514.
118. Van der Bend, R.L., Duetz, W., Colen, A.M., Van Dam, K. Berden, J.A. (1985) Differential effects of triphenyltin and 8-azido-ATP on the ATP synthesis, ATP-Pi exchange, and ATP hydrolysis in liposomes containing ATP synthase and bacteriorhodopsin, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **241**, 461–471.
119. Johnson, K.M., Swenson, L., Opirari, A.W. Jr., Reuter, R., Zarrabi, N., Fierke, C.A., Borsch, M., Glick, G.D. (2009) Mechanistic basis for differential inhibition of the F1F0-ATPase by aurovertin, *Biopolymer*, **91**, 830–840.
120. Chang, T., Penefsky, H.S. (1973) Aurovertin, a fluorescent probe of conformational change in beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase, *The Journal of Biological Chemistry*, **248**, 2746–2754.
121. Linnett, P.E., Beechey, R.B. (1979) Inhibitors of the ATP synthethase system, *Methods in Enzymology*, **55**, 472–518.

122. Lang, D.R., Racker E. (1974) Effects of quercetin and F1 inhibitor on mitochondrial ATPase and energy-linked reactions in submitochondrial particles, *Biochimica et Biophysica Acta*, **333**, 180–186.
123. Roveri, O.A., Vallejos, R.H. (1974) Spegazzinine, a new inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Biochimica et Biophysica Acta*, **333**, 187–194.
124. Zharova, T.V., Vinogradov, A.D. (2017) Functional heterogeneity of $F_o \cdot F_1 H^+$ -ATPase/synthase in coupled *Paracoccus denitrificans* plasma membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1858**, 939–944.
125. Жарова Т.В., Козловский В.С., Гривенникова В.Г. (2022) Взаимодействие $F_o \cdot F_1$ АТФазы/АТФ синтазы *Paracoccus denitrificans* и вентурицидина в условиях генерации мембранного потенциала, *Биохимия*, **87**, 1077–1087.
126. Bald, D., Amano, T., Muneyuki, E., Pitard, B., Rigaud, J.L., Kruij, J., Hisabori, T., Yoshida, M., Shibata, M. (1998) ATP synthesis by F0F1-ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition, *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 865–870.
127. Hong, S., Pedersen, P.L. (2008) ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **72**, 590–641.
128. Виноградов А.Д. (1984) Каталитические свойства АТФ-синтетазы митохондрий, *Биохимия*, **49**, 1220–1238.
129. Gao, Y.Q., Yang, W., Karplus, M. (2005) A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F1-ATPase, *Cell*, **23**, 195–205.
130. Zharova, T.V., Vinogradov, A.D. (2006) Energy-linked binding of P_i is required for continuous steady-state proton-translocating ATP hydrolysis catalyzed by $F_o \cdot F_1$ ATP synthase, *Biochemistry*, **45**, 14552–14558.
131. Zharova, T.V., Vinogradov, A.D. (2006) Requirement of medium ADP for the steady-state hydrolysis of ATP by the proton-translocating *Paracoccus denitrificans* $F_o \cdot F_1$ -ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1757**, 304–310.
132. Schafer, G. (1982) Differentiation of two states of F_1 -ATPase by nucleotide analogs, *FEBS Letters*, **139**, 271–275.
133. Zharova, T.V., Vinogradov, A.D. (2014) ATPase/synthase activity of *Paracoccus denitrificans* $F_o \cdot F_1$ as related to the respiratory control phenomenon, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1837**, 1322–1329.
134. Turina, P. (2022) Modulation of the H^+ /ATP coupling ratio by ADP and ATP as a possible regulatory feature in the F-type ATP synthases, *Frontiers in Molecular Biosciences*, **9**, 1023031.
135. Guo H., Courbon G.M., Bueler S.A., Mai J., Liu J., Rubinstein J.L. (2021) Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline. *Nature*, **589**, 143–147.
136. Yarlagadda, V., Medina, R., Wright, G.D. (2020) A membrane-active natural product inhibitor of ATP synthase potentiates aminoglycoside antibiotics, *Scientific Reports*, **10**, 8134.
137. Milgrom, Y.M., Duncan, T.M. (2021) Complex effects of macrolide venturicidins on bacterial F-ATPases likely contribute to their action as antibiotic adjuvants, *Scientific Reports*, **11**, 13631.
138. Harden S.A., Courbon G.M., Liang Y., Kim A.S., Rubinstein J.L. (2024) A simple assay for inhibitors of mycobacterial oxidative phosphorylation, *Journal of Biological Chemistry*, **300**, 105483.