

БИОХИМИЧЕСКАЯ И СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА F₀F₁-АТФ-СИНТАЗЫ *Streptomyces fradiae* ATCC 19609*

© 2015 М.Г. Алексеева¹, Т.А. Мирончева¹, Д.А. Мавлетова¹,
С.М. Елизаров², Н.В. Захаревич¹, В.Н. Даниленко^{1**}

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
119991 Москва, ул. Губкина, 3; факс: +7(499)132-8962,
электронная почта: valerid@rutenia.ru

² Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва,
Ленинский просп., 33, корп. 2; факс: +7(495)954-2732

Поступила в редакцию 22.07.14
После доработки 27.10.14

Исследовано фосфорилирование белков в препаратах суббактериальных инвертированных мембранных везикул *Streptomyces fradiae* ATCC 19609, содержащих мембраносвязанные F₀F₁-АТФ-синтазы. Методом двумерного электрофореза с последующим масс-спектрометрическим анализом впервые установлено, что в составе синтазного комплекса осуществляется фосфорилирование β- и b-субъединиц; идентифицировано 20 белков с установленными функциями. Осуществлено клонирование генов F₀F₁-АТФ-синтазы в *Escherichia coli* и получены рекомбинантные белки всех восьми субъединиц: α, β, γ, δ, ε, a, b и c. С использованием суммарного препарата серин-треониновых протеинкиназ (СТПК) впервые показано фосфорилирование рекомбинантных γ-, β-, α- и ε-субъединиц. В обоих типах экспериментов наблюдалось фосфорилирование β-субъединицы F₀F₁-АТФ-синтазы. Отличия в фосфорилировании белков во фракции мембранных везикул и рекомбинантных белков могут быть связаны с присутствием разных СТПК в используемых препаратах, а также зависеть от этапов сборки и функционирования F₀F₁-АТФ-синтазы. Установлена структура оперона, содержащая все субъединицы и регуляторный белок I. Исследовано филогенетическое сходство субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 с субъединицами различных групп сапрофитных и патогенных бактерий (в т.ч. *Mycobacterium tuberculosis*). Полученные результаты могут указывать на значительную роль серин-треониновых протеинкиназ в функционировании F₀F₁-АТФ-синтазы. В практическом плане данные могут быть использованы для конструирования оригинальной тест-системы и создания новых биомишень-направленных лекарств против патогенных бактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: F₀F₁-АТФ-синтаза, АТФаза, серин-треониновые протеинкиназы, инвертированные мембранные везикулы, *Streptomyces*.

Актуальной задачей современной биологии и медицины является поиск новых средств для лечения различных заболеваний человека. Многие исследования, направленные на создание инновационных лекарственных препаратов, основываются на данных о молекулярных мишенях лекарств нового поколения. Одной из популярных в настоящее время биомишеней является F₀F₁-АТФ-синтаза – универсальная молеку-

лярная машина, осуществляющая синтез (и в определенных условиях гидролиз) АТФ в митохондриях эукариот, хлоропластах растений и бактериях. F₀F₁-АТФ-синтаза представляет собой многосубъединичный фермент, состоящий из растворимой F₁-части, катализирующей синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет ротационного движения центрального стержня молекулы, и связанной с ней F₀-части, погруженной в мембрану молекулы [1, 2]. F₁-часть F₀F₁-АТФ-синтазы бактерий включает пять субъединиц: α, β, γ, δ и ε. F₀-часть синтазы содержит три субъединицы: a, b и c. Этот комплекс присутствует в митохондриях эукариот и клеточной стенке бактерий [3–5].

F₀F₁-АТФ-синтаза вовлечена в поддержание клеточного рН, а также регуляцию эндоцитоза, пролиферации и апоптоза [6, 7]. В последние го-

Принятые сокращения: СТПК – серин-треониновые протеинкиназы, ФМСФ – фенилметилсульфонил-фторид, ТХУ – трихлоруксусная кислота, ДТГ – дитиотреитол, KN-62 – ингибитор Ca²⁺-зависимых протеинкиназ, Бис-1 – бисиндолилмалеимид-1, п.н. – пары нуклеотидов, а.о. – аминокислотные основания.

* Приложение к статье опубликовано на сайте «Biochemistry» (Moscow), Vol. 80, issue 3, 2015.

** Адресат для корреспонденции.

ды разрабатываются лекарственные препараты, способные воздействовать на функционирование F₀F₁-АТФ-синтазы различных организмов, в первую очередь человека и патогенных бактерий [8, 9]. Ингибирование активности F₀F₁-АТФ-синтазы может осуществляться не только путем взаимодействия с ее собственными субъединицами, но и с сопряженными биомембранами в суббактериальных инвертированных мембранных везикулах. Был разработан новый препарат, ориентированный на F₀F₁-АТФ-синтазу *Mycobacterium tuberculosis*: отобрано соединение бедакуилин, которое ингибирует F₀F₁-АТФ-синтазу микобактерий и показывает высокую и избирательную активность *in vitro* и *in vivo* [10, 11]. F₀F₁-АТФ-синтазы актинобактерий при большом структурном сходстве отличаются от фермента других бактерий зависимостью активности от ионов Ca²⁺ [12, 13] и чувствительностью к антибиотикам олигомицину А [14–17]. Основной биомембранной мишенью действия является с-субъединица F₀F₁-АТФ-синтазы и ее гомолог у эукариотических клеток [18]. Антибиотики семейства олигомицинов и другие ингибиторы F₀F₁-АТФ-синтазы человека и бактерий рассматриваются как потенциальные лекарственные препараты [19], однако их продвижение в качестве фармацевтических препаратов ограничивается высокой токсичностью. Впервые российскими учеными получены более 20 полусинтетических производных олигомицина А, обладающих более низкой токсичностью [20, 21].

В литературе имеются единичные указания на фосфорилирование δ- и с-субъединиц в митохондриях эукариот [22, 23], β-субъединицы в митохондриях скелетной мышцы человека [24] и хлоропластах [25], β-субъединицы у *M. tuberculosis* [26]. Полагают, что фосфорилирование компонентов комплекса может влиять на проницаемость мембран митохондрий (субъединица с), структуру комплекса F₀F₁-АТФ-синтазы (субъединица β) и может иметь PDGF-зависимый характер (субъединица δ). Ранее нами был установлен феномен повышения устойчивости клеток бактерий и F₀F₁-АТФ-синтазы в составе мембранных везикул к олигомицину А в результате появления в клетках нечувствительной к олигомицину А формы F₀F₁-комплекса и определена чувствительность к ингибиторам (олигомицину А и др.) F₀F₁-АТФ-синтазы трех штаммов стрептомицетов *in vivo* и *in vitro*. Впервые было показано, что во фракции мембранных везикул актинобактерии *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 содержатся по крайней мере две активные серин-треониновые протеинкиназы (СТПК), способные фосфорилировать мембранные белки, и их активность регулируется ионами Ca²⁺

[17]. Построена структура F₀F₁-АТФ-синтазного оперона и осуществлено филогенетическое сравнение субъединиц кодируемых им белков с аналогичными белками различных групп сапрофитных и патогенных бактерий.

Основной целью работы является изучение фосфорилирования белков F₀F₁-АТФ-синтазного комплекса *S. fradiae* ATCC 19609 с использованием двух подходов: 1) в составе мембранных везикул, включающих мембраносвязанные СТПК, и 2) путем фосфорилирования рекомбинантных белков всех восьми субъединиц, полученных в *Escherichia coli*, суммарным препаратом СТПК *S. fradiae* ATCC 19609.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы, векторы, среды и условия культивирования. В работе использован штамм *S. fradiae* ATCC 19609 (геном штамма секвенирован в лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН, последовательность генома депонирована в GenBank под номером JNAD000000000) и штаммы *E. coli* DH5α (F⁻, Φ80 ΔlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169) фирмы «Promega» (США) [27] и BL21(DE3) (F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻m_B⁻) *gal λ* (DE3)), плазида pET32a фирмы «Novagen» (США) [28]. Для выращивания штамма *S. fradiae* ATCC 19609 использовали жидкую среду YEME с 25% сахарозы (*m/V*) [29] при 28° в течение 24 ч (позднелогарифмический рост), мицелий собирали в течение 30 мин центрифугированием при 3000 g. Для выращивания клеток *E. coli* использовали среду Лурия (L-бульон). Твердые среды содержали 2,0% агара (*m/V*) [30]. Для обеспечения селективного роста плазмидосодержащих клеток добавляли ампициллин (100 мкг/мл).

Манипуляции с ДНК. Тотальную ДНК штамма *S. fradiae* ATCC 19609 выделяли методом, изложенным в руководствах Кизер с соавт. [29]. Выделение плазмидной ДНК, приготовление компетентной культуры *E. coli*, трансформацию и анализ рекомбинантных плазмид проводили с использованием стандартных методов [30]. ПЦР с тотальной ДНК штамма *S. fradiae* ATCC 19609 проводили с использованием набора РСК-100 («Dialat Ltd.», Россия) на приборе РТС-0150 («MJ Research, Inc.», США). Для амплификации фрагментов ДНК всех субъединиц было сконструировано 10 олигонуклеотидов, гомологичных фланкирующим областям α-, с-, b-, δ-, α-, γ-, β- и ε-субъединиц F₀F₁-АТФ-синтаз, находящихся в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) штаммов *S. coelicolor*, *S. lividans* и *S. avermitilis* с использованием программы NCBI/Primer-

BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Олигонуклеотиды для клонирования были сконструированы на основании секвенирования нуклеотидных последовательностей амплифицированных субъединиц (табл. 1). Амплифицированные субъединицы клонировали в экспрессионный вектор pET32a по сайтам эндонуклеаз

рестрикции *EcoRI* и *HindIII*. Скрининг полученных рекомбинантных клонов проводили с помощью ПЦР с использованием стандартных праймеров S · Tag и T7term.

Изучение экспрессии генов F₀F₁-АТФ-синтазы в *E. coli*. Экспрессию генов субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609

Таблица 1. Олигонуклеотиды, используемые в работе

Олигонуклеотид	Структура олигонуклеотида (5'–3')*	Рестриктаза
АТРАН	CCATGCGCCACGCTGAAGG	–
АТРАС	TGCTCAGTGGTGCTCGGC	–
АТРСН	CGGTGGCCAACCCCCAC	–
АТРСС	AGGCCGATGACGAGCTCGGGGA	–
АТРВН	GGCGGCCGGCCTGATCCGC	–
АТРВС	GGCCAGCTCGTCGGCGAGC	–
АТРПН	ATGCCGTCCAATGACGTCCG	–
АТРПС	CTCCTTCAGCGTGGCGCATG	–
Del(+)	CGGCAGCGCGAGGAGATCAT	–
Del(–)	GACCTCCTCGCGCGAGGCCG	–
Alp(+)	TAGCCTGGAGTCGGGACTC	–
Alp(–)	GTGACGGATCGGATGCGACG	–
Gam(+)	GCACCACCGGCAAGATGGAC	–
Gam(–)	GGAGATGGTGCGGACCAGGC	–
Beta(+)	AATCAGCGAGATCGTCGGTGCC	–
Beta(–)	GACGTGCAGCTCAGCAGCCA	–
Eps(+)	GGCGTTCTTCATGTGCGGTGGC	–
Eps(–)	CCGCACACAGTCAGAGCGAG	–
АТРФАН	ATCCGAATTCGTGAGTGCTGACCCGACAACG	<i>EcoRI</i>
АТРФАС	CCGCAAGCTTGTGGTGCTCTGCGAGAGCG	<i>HindIII</i>
АТРФСН	ATCCGAATTCATGTCCAGACCCTTGCTGC	<i>EcoRI</i>
АТРФСС	CCGCAAGCTTACGAACGGCATGACGAGGCC	<i>HindIII</i>
АТРФСН	ATCCGAATTCGTGAACGTTCTGGTTCACCT	<i>EcoRI</i>
АТРФСВ	CCGCAAGCTTGTGCGCCGGCCTCGGCCTTC	<i>HindIII</i>
DelN	ATCCGAATTCATGAACGGAGCGAGCCGCG	<i>EcoRI</i>
DelC	CCGCAAGCTTGCCGGCCATCCGCCGGGA	<i>HindIII</i>
AlpN	ATCCGAATTCATGGCGGAGCTCACGATCCG	<i>EcoRI</i>
AlpC	CCGCAAGCTTCTTGCCGGCGGCCGGAACGT	<i>HindIII</i>
GamN	ATCCGAATTCATGGGTGCCAGATCCGGGT	<i>EcoRI</i>
GamC	CCGCAAGCTTCCTGTCACTCCCCGCGGTCCG	<i>HindIII</i>
BetaN	ATCCGAATTCATGACCACCTGTTGAGCCG	<i>EcoRI</i>
BetaC	CCGCAAGCTTCAGAATAACGGGCGTGATCC	<i>HindIII</i>
EpsN	ATCCGAATTCCTTGCTGCTGAGCTGCACGT	<i>EcoRI</i>
EpsC	CCGCAAGCTTGCCTTGCTCGCGGCCGCG	<i>HindIII</i>

* Жирным шрифтом выделены сайты узнавания рестриктаз *EcoRI* (GAATTC) и *HindIII* (AAGCTT).

проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3). Для изучения экспрессии белка и наработки биомассы клетки *E. coli*, содержавшие сконструированные плазмиды, выращивали на качалке в жидкой среде (L-бульон) с ампициллином при 34° до оптической плотности 0,6 (~2 ч), затем индуцировали экспрессию добавлением ИПТГ до финальной концентрации 1,0 мМ. Далее проводили культивирование при 28° в течение 4 ч, после чего отбирали биомассу, которую суспендировали в буфере следующего состава: 62,5 мМ Tris-HCl, (рН 6,8), 5%-ный глицерин (*m/V*), 2%-ный меркаптоэтанол (*m/V*), 0,1%-ный Ds-Na, бромфенолтолуол синий. Затем клетки разрушали кипячением в течение 10 мин. Растворимую фракцию белков анализировали с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза. В качестве контроля анализировали растворимую фракцию белков штамма *E. coli* BL21(DE3), содержавшего плазмиду рЕТ32а без вставки. Рекомбинантные белки из экстрактов выделяли в нативных условиях хроматографией на His-связывающих Ni-NTA колонках («Qiagen», Германия) согласно протоколу QIAexpress.

Получение препаратов мембранных везикул для протеомного анализа. Мицелий *S. fradiae* ATCC 19609 трижды отмывали в 0,1 М Tris-HCl, рН 7,5. Клетки суспендировали в 10 объемах буфера, содержавшего 50 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10%-ный глицерин (*m/V*), 1 мМ фенилметансульфонил фторид (ФМСФ), 0,5 мМ дитиотреитол (ДТТ), коктейль ингибиторов протеаз («Promega», США), с добавлением лизоцима до конечной концентрации 1 мг/мл. Полученную суспензию инкубировали при 37° при постоянном перемешивании в течение 30 мин. Протопласты разрушали озвучиванием в ультразвуковом дезинтеграторе Vibra Cell™ Ultrasonic Processor («Sonics», США) при частоте 20 кГц трижды по 30 с с интервалом между обработками 15 с при 4°. Клеточные обломки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 4° и 10 000 g. Для выделения везикул белки супернатанта центрифугировали в течение 10 ч при 4° и 100 000 g, суспендировали в том же буфере (без лизоцима) и центрифугировали в течение 16 ч при 4° и 150 000 g. Полученные осадки растворяли в шести объемах буфера (без лизоцима). Концентрацию белка определяли на флуориметре Qubit 2.0 («Invitrogen», США). Мембранные везикулы замораживали в жидком азоте и хранили при -70°.

Фосфорилирование белков мембранных везикул. Проводили в течение 10 мин при 25° в буфере, содержавшем 25 мМ Tris-HCl (рН 7,4), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ MnCl₂, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ФМСФ. Реакцию начинали добавлени-

ем АТФ до конечной концентрации 100 мкМ, содержавшей 10–20 мкКи [γ-³²P]-АТФ (5000 Ки/мМ (186 ПБк/М), ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН), в присутствии 100 мкг белка везикул. Белки осаждали пятью объемами холодного ацетона, выдерживали 2 ч при -20°, осадки собирали центрифугированием в течение 20 мин при 4° и 20 000 g. Подсушенные осадки растворяли в буфере, содержавшем 8,5 М мочевины, 2%-ный Тритон X-100 (*m/V*), 2,2% амфолиты (*m/V*), 5%-ный β-меркаптоэтанол (*m/V*), удаляли нерастворенные агрегаты центрифугированием, супернатант использовали для дальнейшего разделения методом двумерного электрофореза.

Двумерный гель-электрофорез (SDS-PAGE). Проводили по методике О'Фаррелла [31] с небольшими модификациями. Подготовку образцов для масс-спектрометрии осуществляли по методике, рекомендованной фирмой «Promega», США (In Gel Digest Protocol), масс-спектры получены методом, рекомендованным фирмой «Bruker Daltonics» (США), на аналитическом масс-спектрометре Bruker Daltonics (UltrafleXtreme Maldi Tof/Tof Ms) («Bruker Daltonics GmbH», Германия) в отделе протеомных исследований НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск производили в базе данных NCBI.

Получение мембранных везикул для фосфорилирования субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы. Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 выращивали в основной жидкой питательной среде, приготовленной, как описано ранее [32, 33], до поздней экспоненциальной фазы роста, собирали мицелий центрифугированием, суспендировали в буфере, содержавшем 50 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10%-ный глицерин (*m/V*), 1 мМ ФМСФ, 0,5 мМ ДТТ, 1 мг/мл лизоцима и 1 мкг/мл ДНКазы, и получали протопласты, инкубируя 30 мин при 37°. Протопласты разрушали озвучиванием в отечественном ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1, У-42 в течение 3 мин при частоте 30 кГц, после чего удаляли клеточный дебрис центрифугированием в течение 20 мин при 4° и 10 000 g. Мембранные везикулы осаждали центрифугированием в течение 120 мин при 4° и 180 000 g, промывали указанным выше буфером и хранили в жидком азоте.

Фосфорилирование субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы. Фосфорилирование субъединиц проводили в течение 10 мин при 28° в буфере, содержавшем 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ ФМСФ, 0,01%-ный Tween-20, 10%-ный глицерин (*m/V*)

(рН 7,8) и 0,5 мМ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (5000 имп/мин на пмоль; «Фосфор», Россия), в присутствии 100 мкг/мл белка.

Суммарный препарат СТПК *S. fradiae* ATCC 19609 выделяли из экстрактов бактерии хроматографией на цибаcron-сефарозе [34].

Анализ АТФазной активности в мембранных везикулах *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 проводили по высвобождению $^{32}\text{P}_i$ после отделения его от связанной с активированным углем марки «Norit А» $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ по методике, описанной ранее [17]. Во всех случаях приводили усредненные значения трех независимых измерений со среднеквадратичными отклонениями.

Биоинформатические методы анализа. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей субъединиц $F_0F_1\text{-ATP}$ -синтаз бактерий проводился по нуклеотидным и аминокислотным базам данных, доступным на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Анализ последовательностей выполнялся при помощи программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Выравнивания субъединиц проводились с помощью программ ClustalW [34] и TCOFFEE (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>) [35]. Для визуализации выравнивания использовали программу GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>) [36]. Процент идентичности аминокислотных последовательностей вычислялся при помощи программы Blastp [37]. Филогенетические деревья построены с помощью пакета программ MEGA v. 5.1 [38] с использованием алгоритма ближайших соседей (neighbor-joining) [39]. Для оценки достоверности топологии полученного филогенетического дерева применяли bootstrap-анализ (1000 реплик) [40]. Для картирования потенциальных сайтов фосфорилирования использовали программы NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) и NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ АТФазной активности *S. fradiae* ATCC19609 в мембранных везикулах. Везикулы, содержавшие $F_0F_1\text{-ATP}$ -синтазу, были изолированы из *S. fradiae* ATCC 19609, затем была определена АТФазная активность по отщеплению γ -фосфорильного остатка от $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ в присутствии ингибиторов СТПК и без них. Везикулы прединкубировали с АТФ и ингибиторами АТФазы и СТПК, после чего определяли их АТФазную активность в присутствии олигомицина А или без него. Показано, что в присутствии 10 мМ CaCl_2 активность $F_0F_1\text{-ATP}$ -синта-

зы составляла 157 ± 19 ед активности/мг белка, а в присутствии 10 мМ MgCl_2 — 104 ± 7 ед активности/мг белка мембранных везикул (1 ед активности равна 1 нМ фосфата, высвобождаемого за 1 мин в присутствии 1 мг белка в стандартных условиях). Различия в эффективности двухвалентных катионов могут объясняться отличиями в атомной структуре их комплекса с нуклеотидным субстратом, влияющими на конформационные изменения в каталитическом центре фермента, и обнаружены ранее у АТФаз разных видов *Streptomyces* [12, 13]. Было проанализировано действие возрастающих концентраций селективного ингибитора АТФаз F-типа олигомицина А на АТФазную активность и показано, что значения IC_{50} олигомицина А в отношении Ca^{2+} -зависимой АТФазной активности в препаратах мембранных везикул составляют 165 ± 23 нМ, а Mg^{2+} -зависимой — 110 ± 11 нМ. В отдельных опытах мы показали, что действующий на F_0 -часть ингибитор дициклогексилкарбодиимид в концентрации 0,05 мМ снижает АТФазную активность исследуемого штамма до уровня 7–10% от исходного. Далее везикулы *S. fradiae* прединкубировали с ингибиторами СТПК и определяли их АТФазную активность в присутствии олигомицина А и без него. Из представленных в табл. 2 результатов видно, что ингибитор Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ KN-62 в концентрации 5,0 мкМ понижает активность на 25%, а АТФ-конкурентный ингибитор киназ бисиндолилмалеимид-1 (Бис-1) в концентрации 1,0 мкМ — на 23%. При этом определяемая АТФазная активность почти целиком может быть отнесена на счет $F_0F_1\text{-ATP}$ -синтазы, т.к. ее специфические ингибиторы дициклогексилкарбодиимид и олигомицин А подавляют АТФазную активность мембранных везикул на 83 и 56% соответственно. Добавленные по отдельности KN-62 и Бис-1 повышают чувствительность $F_0F_1\text{-ATP}$ -синтазы к олигомицину А на 4–6%, а вместе увеличивают ее чувствительность к олигомицину А почти вдвое (табл. 2). Эти данные говорят в пользу того, что эндогенные мембраносвязанные СТПК вовлечены в активацию $F_0F_1\text{-ATP}$ -синтазы и ее защиту от антибиотика и подтверждают предварительные результаты аналогичного анализа фосфорилирования и возможной регуляции активности $F_0F_1\text{-ATP}$ -синтазы в везикулах *S. fradiae*, опубликованные нами ранее [17].

Получение рекомбинантных белков субъединиц $F_0F_1\text{-ATP}$ -синтазы *S. fradiae* ATCC 19609. Изоляцию генов субъединиц $F_0F_1\text{-ATP}$ -синтазы осуществляли с геномной ДНК методом ПЦР. Для амплификации фрагмента ДНК а-субъединицы использованы олигонуклеотиды АТРАН и АТРАС, с-субъединицы — АТРСН и АТРСС, b-субъеди-

Таблица 2. Влияние олигомицина А и ингибиторов СТПК на активность АТФазы *S. fradiae* ATCC 19609

Ингибитор	Концентрация ингибитора, μM	АТФазная активность, ед/мг белка*	АТФазная активность, % от контроля
Без ингибитора	—	163 \pm 21	100
Олигомицин А	0,25	72 \pm 12	44
KN-62	5,0	102 \pm 15	75
Бис-1	1,0	125 \pm 10	77
Олигомицин А + KN-62	0,25 + 5,0	63 \pm 9	38
Олигомицин А + Бис-1	0,25 + 1,0	66 \pm 8	40
Олигомицин А + KN-62 + Бис-1	0,25 + 5,0 + 1,0	26 \pm 7	16

* Приведены усредненные результаты трех независимых измерений \pm S.D.

ницы – АТРВN и АТРВC, δ -субъединицы – Del(+), Del(–), α -субъединицы – Alp(+), Alp(–), γ -субъединицы – Gam(+), Gam(–), β -субъединицы – Beta(+), Beta(–), ϵ -субъединицы – Eps(+), Eps(–) (табл. 1). При секвенировании всех амплифицированных фрагментов ДНК определены стартовые кодоны трансляции и терминирующие кодоны. Для клонирования всех субъединиц были синтезированы олигонуклеотиды, гомологичные соответственно N- и C-концевым областям генов субъединиц и содержащие в своем составе сайты рестрикции *EcoRI* и *HindIII* (табл. 1). Амплифицированные фрагменты ДНК были секвенированы и клонированы в экспрессионном векторе pET32a, линкер которого содержит His-Tag и S-tag для выделения и очистки белков и последовательность Ttx · Tag (109 а.о.) в N-концевой области. Для изучения экспрессии белков проводили индукцию ИПТГ в течение 1, 2 и 4 ч. Установлено, что максимальный уровень экспрессии генов всех субъединиц достигается при 4 ч индукции. При клонировании δ -, α -, γ -, β -, ϵ -, a-, c- и b-субъединиц в клетках *E. coli*, содержащих плазмиды pET32aAtpH, pET32aAtpA, pET32aAtpG, pET32aAtpD, pET32aAtpC, pET32aAtpB, pET32aAtpE и pET32aAtpF, наблюдались дополнительные фракции белков с соответствующими молекулярными массами 51, 80, 56, 75, 36, 53, 30 и 43 кДа (рис. 1). Эти величины соответствуют расчетным молекулярным массам белков соответствующих субъединиц в сумме с молекулярной массой белка всего линкера плазмиды pET32a, содержащей тиоредоксин. Полученные рекомбинантные белки всех субъединиц были очищены на His-связывающих Ni-NTA

колонках и наработаны в препаративных количествах для последующего изучения их фосфорилирования.

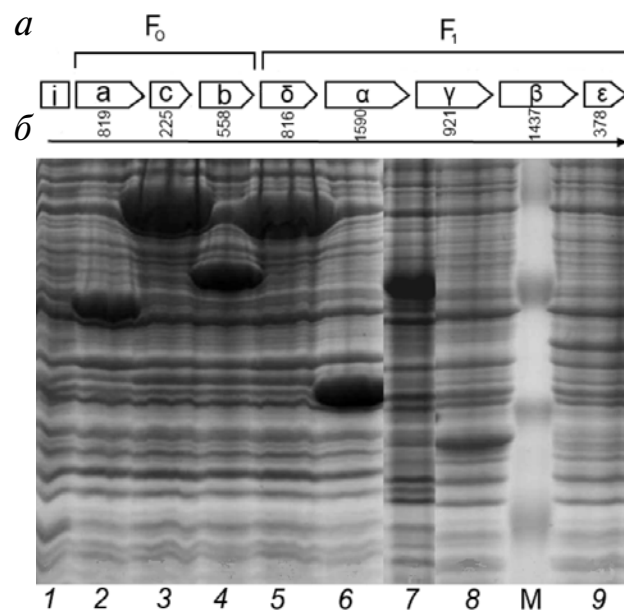


Рис. 1. a – Структура оперона F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609: I-белок, F₀-часть (субъединицы a, c и b) и F₁-часть (субъединицы δ , α , γ , β , ϵ); б – электрофореграмма растворимой фракции белков штамма *E. coli* BL21(DE3). Клоны *E. coli*, содержащие плазмиды: 1 – pET32a (контроль); 2 – pET32aAtpH (субъединица δ); 3 – pET32aAtpA (субъединица α); 4 – pET32aAtpG (субъединица γ); 5 – pET32aAtpD (субъединица β); 6 – pET32aAtpC (субъединица ϵ); 7 – pET32aAtpB (субъединица a); 8 – pET32aAtpE (субъединица c); 9 – pET32aAtpF (субъединица b); M – белковый маркер SM0441 («Fermentas», Литва)

Фосфорилирование рекомбинантных субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 суммарным препаратом СТПК. Анализ фосфорилирования рекомбинантных субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы проводили в присутствии суммарного препарата протеинкиназ *S. fradiae* ATCC 19609, полученного аффинной хроматографией на цибакрон-сефарозе. Для того чтобы исключить искажение результатов за счет эндогенного фосфорилирования в препарате киназ, последние были прединкубированы с немеченой АТФ непосредственно перед добавлением в рабочую смесь для анализа. Затем АТФ была удалена гель-фильтрацией. Смесь для анализа включала уже меченую АТФ и выделенные на His-связывающей смоле субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазы. Включение радиоактивного фосфата в них определяли автордиографией. Из представленных на рис. 2 результатов видно, что наблюдается включение меченого фосфата в белки с молекулярными массами 75 и 56 кДа, представляющие собой слитые с тиоредоксином β - и γ -субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазы соответственно. Удельное мечение γ -субъединицы примерно на порядок выше, чем β -субъединицы. Наблюдается небольшое включение метки в белки с молекулярными массами 80 и 36 кДа, представляющие собой α - и ε -субъединицы. Включение меченого фосфата в другие субъединицы F_0 - и F_1 -части F_0F_1 -АТФ-синтазы (а, б, с и д) не обнаружено. Отсутствие включения также указывает на то, что в полученных рекомбинантных гибридных белках, слитых с тиоредоксином α -, β -, γ - и ε -субъединиц, модифицируются именно субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазы, а не тиоредок-

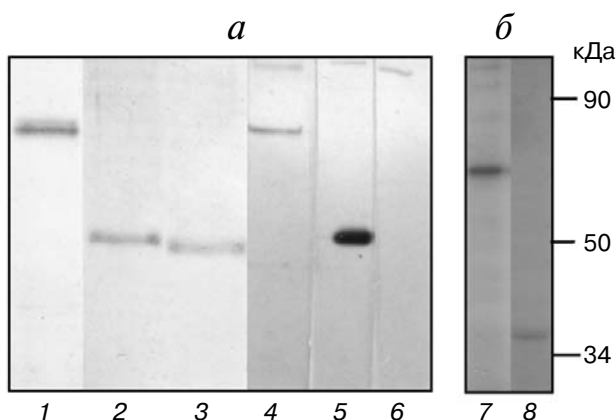


Рис. 2. а – Электрофореграмма гелей после электрофореза рекомбинантных субъединиц α (1), γ (2), δ (3); б – автордиограф фосфорилированных субъединиц α (4), γ (5), δ (6), ε (7) и β (8) F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609

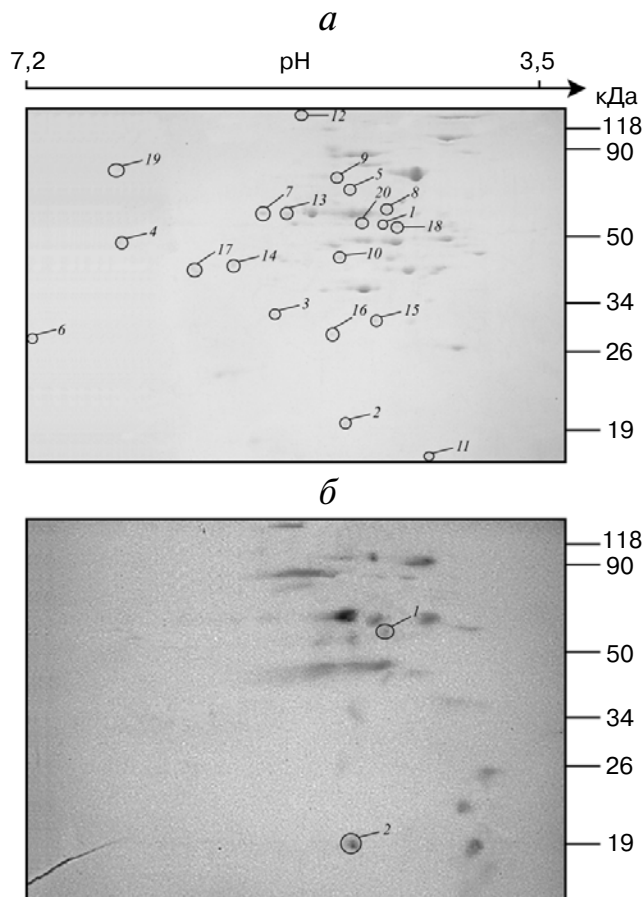


Рис. 3. 2D SDS-PAGE белков мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609. а – Электрофореграмма геля, окрашенного Кумасси G250. 1–20 – белки, идентифицированные с помощью масс-спектрометрического анализа, приведенные в табл. 3; б – автордиограмма. Масс-спектрометрическая идентификация отмеченных полипептидов: 1 – F_1 -часть F_0F_1 -АТФ-синтазы, субъединица β ; 2 – F_0 -часть F_0F_1 -АТФ-синтазы, субъединица β

син. Приведенные доказательства являются первым свидетельством того, что α -, β -, γ - и ε -субъединицы комплекса актиномицетов могут фосфорилироваться эндогенными СТПК.

Идентификация фосфорилированных белков во фракции мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609. Везикулы, изолированные из культуры *S. fradiae* ATCC 19609, инкубировали в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$. Фосфорилированные белки, разделенные методом 2D электрофореза, представлены на рис. 3. Масс-спектрометрический анализ позволил выявить два белка, идентичных, соответственно, β -субъединице F_1 -части и β -субъединице F_0 -части F_0F_1 -АТФ-синтазы. Другие 18 идентифицированных белков можно разделить на семь функциональных групп (табл. 3).

В функциональной группе «преобразование энергии и метаболизм жирных кислот» помимо β- и b-субъединиц представлены белки, которые могут быть связаны с функционированием F₀F₁-АТФ-синтазы. Отсутствие γ-субъединицы в препаратах может объясняться ее селективной потерей в ходе приготовления препаратов к электрофорезу.

Определение структуры оперона F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609. При секвенировании амплифицированных фрагментов ДНК всех субъединиц было установлено, что

оперон F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609 имеет стандартную структуру: F₀-часть – субъединицы a, c и b и F₁-часть – субъединицы δ, α, γ, β и ε (табл. 4). Проведенный сравнительный анализ показал, что нуклеотидные последовательности всех субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609 имеют высокий уровень гомологии с генами соответствующих субъединиц штаммов *S. coelicolor*, *S. lividans* и *S. avermitilis*. Нуклеотидные последовательности генов всех субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609 зарегист-

Таблица 3. Основные белки с установленными функциями, идентифицированные во фракции мембранных везикул *Streptomyces fradiae* ATCC 19609, представленные на рис. 3

Функциональные группы	№*	Функция	Ген	Локализация, номер контига**	Мол. масса, кДа	pI
1. Преобразование энергии и метаболизм жирных кислот	1	β-субъединица F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы	<i>atpD</i>	0001207730...209184	52,38	4,91
	2	b-субъединица F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы	<i>atpF</i>	0001203744...204301	20,23	5,16
	3	АВС-транспортер АТФ-связывающий белок	<i>SCO4240</i>	006816582...17502	31,78	5,54
	4	кротонил СоА редуктаза	<i>SCO6473</i>	00083364...4992	49,27	6,88
2. Метаболизм и транспорт углеводов	5	изоцитратдегидрогеназа	<i>SCO7000</i>	002344255...46474	79,31	5,04
	6	глицерофосфодиэстераза	<i>SCO1565</i>	0015122785...123618	30,64	7,21
	7	глюкоза-6-фосфатизоме- раза	<i>pgi</i>	001068231...69883	60,06	5,97
	8	фосфоенолпируват фосфо- трансфераза	<i>SCO1391</i>	004553716...55386	57,36	4,89
3. Репарация	9	НАД-зависимая ДНК- лигаза	<i>ligA</i>	0001334323...336530	80,83	5,16
4. Трансляция, рибосомальные структуры и биогенез	10	фактор элонгации Tu	<i>SCO1321</i>	002632423...33616	43,87	5,15
	11	50S рибосомальный белок L29	<i>SCO4710</i>	contig0026 46129...46518	13,44	4,61
	12	белок, аденилирующий аминокислоты	<i>SCO2198</i>	000462044...68697	232,26	5,56
5. Транспорт и метаболизм аминокислот, биосинтез антибиотиков	13	1-пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназа	<i>SCO5520</i>	01022059...3690	58,49	5,72
	14	сенсорный белок трансдукции <i>cytC1</i>	<i>SACTE_2966</i>	00804231...5403	41,33	6,20
6. Посттрансляционные модификации и фолдинг	15	SAM-зависимая метил- трансфераза	<i>SCO0995</i>	0001197491...198315	30,25	5,10
	16	ацетилтрансфераза GCN5- семейства	<i>SCO0995</i>	003923628...24401	28,01	5,69
	17	оксидоредуктаза SCO4595	<i>SCO4595</i>	00104454...15731	44,52	6,41
	18	шаперон GroEL	<i>groEL</i>	000998884...100506	56,80	4,90
7. Транспорт и метаболизм неорганических ионов	19	АВС-транспортер металлов АТФазы	<i>SCO2505</i>	0009130411...132894	87,07	6,74
	20	Fe-S кластер сборки белка SufB	<i>SCO1925</i>	001048435...49856	54,45	5,00

* Номера белков, обозначенных на рис. 3, а.

** Локализация нуклеотидных последовательностей в базе NCBI для *S. fradiae* ATCC 19609.

Таблица 4. Структура оперона F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609

Субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазы <i>S. fradiae</i>	Длина гена, п.н.	Длина белка, а.о.	Мол. масса, кДа	<i>pI</i>
F_0 a AtpB	819	272	30,24	8,95
F_0 c AtpE	225	74	7,41	4,78
F_0 b AtpF	558	185	20,23	5,16
F_0 δ AtpH	816	271	28,94	5,54
F_1 α AtpA	1590	529	57,21	5,01
F_1 γ AtpG	921	306	32,70	6,07
F_1 β AtpD	1437	478	52,38	4,91
F_1 ϵ AtpC	378	125	13,07	5,03

рированы в GenBank (KC169996, KC169997, KC169998, KC169999, KC170000, KC170001, KC170002, KC170003). Оперон F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609 представлен на рис. 1, а. В настоящее время в лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН проведено полногеномное секвенирование штамма *S. fradiae* ATCC 19609, аминокислотные последовательности депонированы в GenBank (JNAD00000000). Были аннотированы гены F_0F_1 -АТФ-синтазы, нуклеотидные последовательности всех субъединиц совпали с ранее секвенированными.

Сравнительный анализ субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтаз из штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, *S. lividans* ТК24 и *S. avermitilis* МА-4680. В данном эксперименте для исследований выбраны наиболее генетически изученные штаммы *S. lividans* ТК24 и *S. avermitilis* МА-4680. Выравнивание аминокислотных последовательностей восьми субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы из штамма *S. fradiae* ATCC 19609 с субъединицами из штамма *S. lividans* ТК24 (чувствительного к олигомицину А) и штамма *S. avermitilis* МА-4680 – продуцента олигомицина А (устойчивого к олигомицину А) показало, что субъединицы а, с, b, α , β из штамма ATCC 19609 имеют большее сходство с аналогичными субъединицами из штамма ТК24, а субъединицы δ и γ из штамма ATCC 19609 – с субъединицами из штамма МА-4680. Последовательность субъединицы ϵ сходна во всех трех штаммах. Данные сравнительного анализа оперона F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 с оперонами F_0F_1 -АТФ-синтаз *S. lividans* ТК24 и *S. avermitilis* МА-4680 приведены в табл. 5.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей, находящихся до и после генов F_0F_1 -АТФ-синтазы на хромосоме, показал

наличие I-белка, идентичность (сходство) с соответствующими аминокислотными последовательностями штаммов *S. lividans* и *S. avermitilis* МА-4680 составили 64 (77) и 64 (80)% соответственно, по нуклеотидным последовательностям гомология не превышает 35–38%. Окружение генов F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609 полностью совпадает с окружениями, характерными для большинства штаммов рода *Streptomyces* (за исключением штаммов *S. avermitilis*): со стороны 5'-конца хромосомы непосредственно перед опероном расположены гены тирозин-фосфатазы, сериновой гидроксиметилтрансферазы и трансферазы; за опероном расположены гены секретируемого белка и хитиназы С. У штаммов *S. avermitilis* перед опероном расположены гены синтеза олигомицина А – ингибитора F_0F_1 -АТФ-синтазы.

Филогенетический анализ субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазного оперона из штаммов рода *Streptomyces*. Для установления филогенетического родства субъединиц F_1 -части F_0F_1 -АТФ-синтазного оперона проведены выравнивание аминокислотных последовательностей α -, β -, δ - и γ -субъединиц для различных представителей рода *Streptomyces* и оценка идентичности последовательностей по отношению друг к другу. На основании выравнивания аминокислотных последовательностей четырех субъединиц (α , β , δ и γ) F_1 -части F_0F_1 -АТФ-синтазного оперона построено четыре филогенетических дерева для бактерий рода *Streptomyces* (рис. 4).

Как видно из рис. 4, на трех деревьях, построенных для субъединиц β , δ и γ , ближайшими соседями вида *S. fradiae* являются виды *S. violaceusniger*, *S. bingchenggensis*, *S. cattleya*, в отличие от дерева, построенного для субъединицы α .

Таблица 5. Сравнительный анализ оперона F₀F₁-АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 с оперонами F₀F₁-АТФ-синтаз *S. lividans* TK24 и *S. avermitilis* MA-4680

Субъединицы F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы <i>S. fradiae</i>	Гомология с F ₀ F ₁ -АТФ-синтазой <i>S. fradiae</i> ATCC 19609, %			
	<i>S. lividans</i> TK24		<i>S. avermitilis</i> MA-4680	
	идентичность	сходство	идентичность	сходство
F ₀ a AtpB	78,8	91,2	76,1	88,3
F ₀ c AtpE	92,1	96,0	85,1	90,0
F ₀ b AtpF	84,0	89,0	80,0	85,0
F ₀ δ AtpH	68,8	88,6	75,5	93,8
F ₁ α AtpA	98,7	99,8	94,3	98,1
F ₁ γ AtpG	76,1	89,0	80,0	85,0
F ₁ β AtpD	89,3	96,0	86,0	93,0
F ₁ ε AtpC	83,0	92,0	84,0	92,0

На дереве для α-субъединицы ближайшими соседями для вида *S. fradiae* являются виды *S. coelicolor*, *S. avermitilis* и *S. scabiei*. Это может говорить о том, что субъединицы F₁-части F₀F₁-АТФ-синтазного оперона эволюционировали раздельно.

Сравнительный анализ субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазного оперона из штаммов рода *Streptomyces*. При выравнивании аминокислотных последовательностей субъединицы α и β показали высокую степень консервативности. Идентичность этих субъединиц составляет 88–99%. Субъединицы δ и γ оказались менее консервативными, идентичность составляет 75–92%. Консервативные области в этих субъединицах покрывают почти всю их аминокислотную последовательность (рис. 1–4 в Приложении, выделение черным цветом). Однако последовательность γ-субъединицы (рис. 4 в Приложении) полностью секвенированного генома вида *S. bingchenggensis* короче своих гомологов из других видов стрептомицетов на 56 а.о. В связи с чем эта субъединица утратила часть аминокислот в N-концевой части своей последовательности – неизвестно. Обнаружены вставки различной протяженности в γ-субъединице у растений и бактерий *M. tuberculosis*. Эти изменения рассматриваются как адаптация субъединицы к выполнению функции синтеза АТФ у различных организмов [9].

Сравнительный анализ субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазного оперона у актинобактерий. Методами биоинформатического анализа проведено сравнение восьми субъединиц F₀F₁-АТФ-синтаз,

принадлежащих различным актинобактериям. Результаты проведенного анализа показали, что структура оперона F₀F₁-АТФ-синтаз всех актинобактерий сходна. Выравнивание аминокислотных последовательностей субъединиц α, β, δ и γ из разных видов, относящихся к типу *Actinobacteria* (рис. 5–8 Приложения), показало, что субъединицы α и β консервативны на протяжении почти всей своей длины (идентичность >70%). Наиболее варибельные участки наблюдаются у субъединиц α и β лишь в C-концевой части последовательности, а у субъединицы β являются варибельными еще и первые 40 а.о.

Субъединицы δ и γ менее консервативны (идентичность субъединицы γ лежит в интервале 78–33%, а субъединицы δ – в интервале 71–30%). В субъединице γ наблюдается область протяженных делеций примерно в середине аминокислотной последовательности. В субъединице δ область делеций расположена в N-концевой части последовательности, а идентичные участки представлены единичными консервативными аминокислотными остатками, расположенными в основном в центре и на конце последовательности.

Интересно отметить, что в аминокислотных последовательностях α-, β- и γ-субъединиц, принадлежащих штаммам пробиотических анаэробных актинобактерий рода *Bifidobacterium*, присутствуют дополнительные аминокислотные участки – инверсии: в субъединице α – 222–226 а.о., в субъединице β – 53–56 и 119–121 а.о., в субъединице γ – с 205–211 а.о. Изучение

функциональной значимости этих отличий для функционирования F_0F_1 -АТФ-синтазы в составе микробиоты человека в анаэробных условиях является предметом дальнейшего исследования.

Филогенетический анализ F_0F_1 -АТФ-синтаз актинобактерий. На основании выравнивания аминокислотных последовательностей четырех субъединиц α , β , δ и γ F_1 -части F_0F_1 -АТФ-синтазного оперона из различных видов актинобактерий нами было построено четыре филогенетических дерева (рис. 5). Все четыре дерева отражают эволюционное расхождение видов. Для самых близких к роду *Streptomyces* родов бактерий указан процент идентичности для каждой субъединицы (рис. 5). Из полученных данных видно, что наиболее консервативными в процессе эволюции являются субъединицы α и β (что уже было показано выше), т.к. проценты

идентичности этих субъединиц выше, чем субъединиц δ и γ .

Сравнительный анализ субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса из *S. fradiae* ATCC 19609 с АТФазами из патогенных микроорганизмов. Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 рассматривается как удобная тест-система для исследования ингибиторов F_0F_1 -АТФ-синтазы бактерий, включая производные олигомицинов [17, 20, 21]. Поэтому представляло интерес посмотреть сходство белков этого оперона с соответствующими белками некоторых патогенных бактерий. Мы провели выравнивание аминокислотных последовательностей восьми субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтаз из *S. fradiae* с субъединицами F_0F_1 -АТФаз из *M. tuberculosis* (тип (отдел) *Actinobacteria*) и *C. difficile* (тип (отдел) *Firmicutes*). Эти выравнивания показали следующее: 1) субъединицы α и β остаются

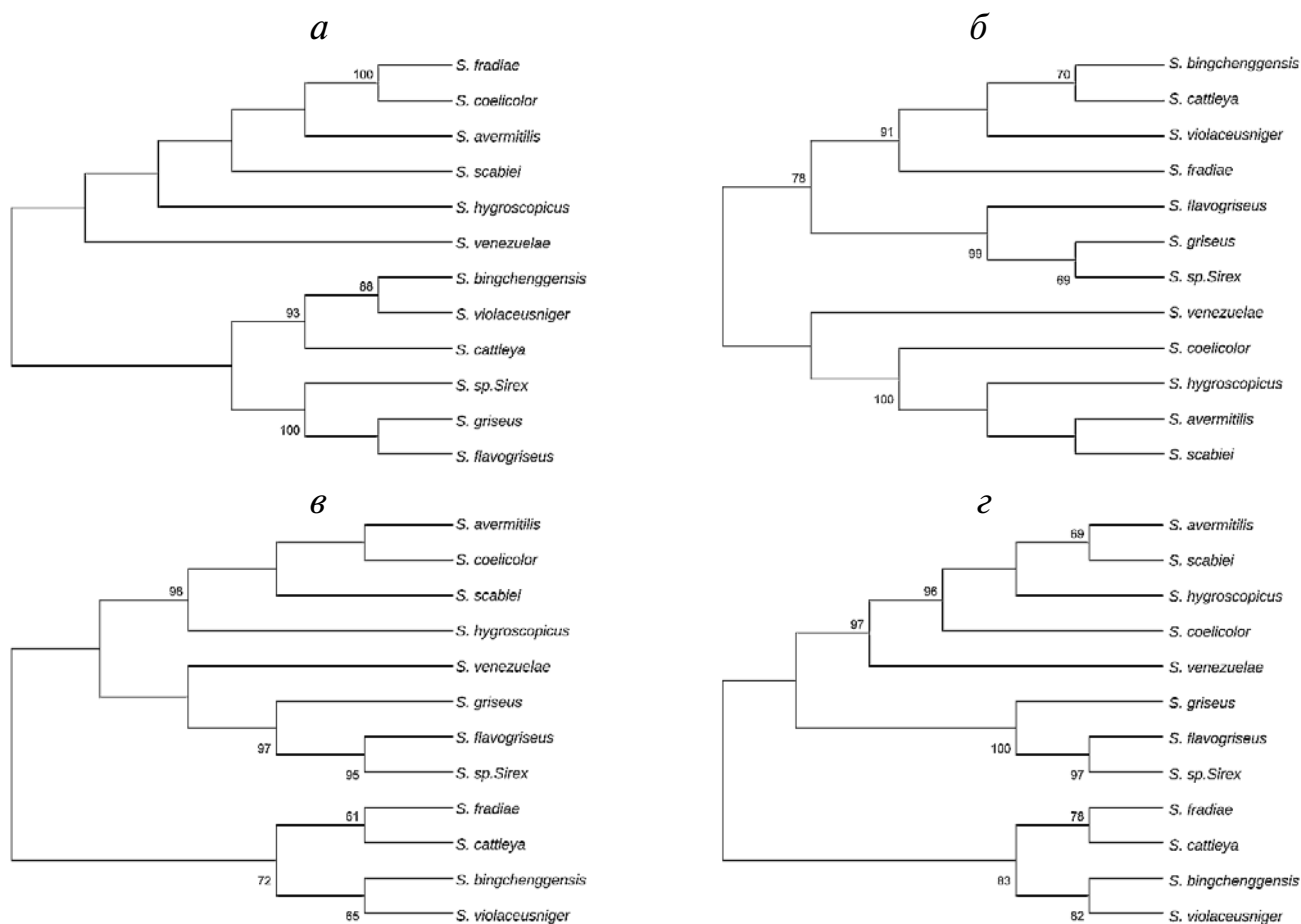


Рис. 4. Филогенетические деревья представителей рода *Streptomyces*, основанные на сравнении четырех субъединиц F_1 -части F_0F_1 -АТФ-синтазного оперона. а – α -Субъединица; б – β -субъединица; в – δ -субъединица; з – γ -субъединица. Деревья построены с помощью пакета программ MEGA 5 по выравниванию аминокислотных последовательностей с использованием алгоритма neighbor-joining (NJ), используя модель p-distance. Цифрами показана устойчивость ветвей, рассчитанная для NJ-анализа методом бутстреп (1000 реплик). Ветви, воспроизводимые менее чем в 60% бутстреп-реплик, не отмечены

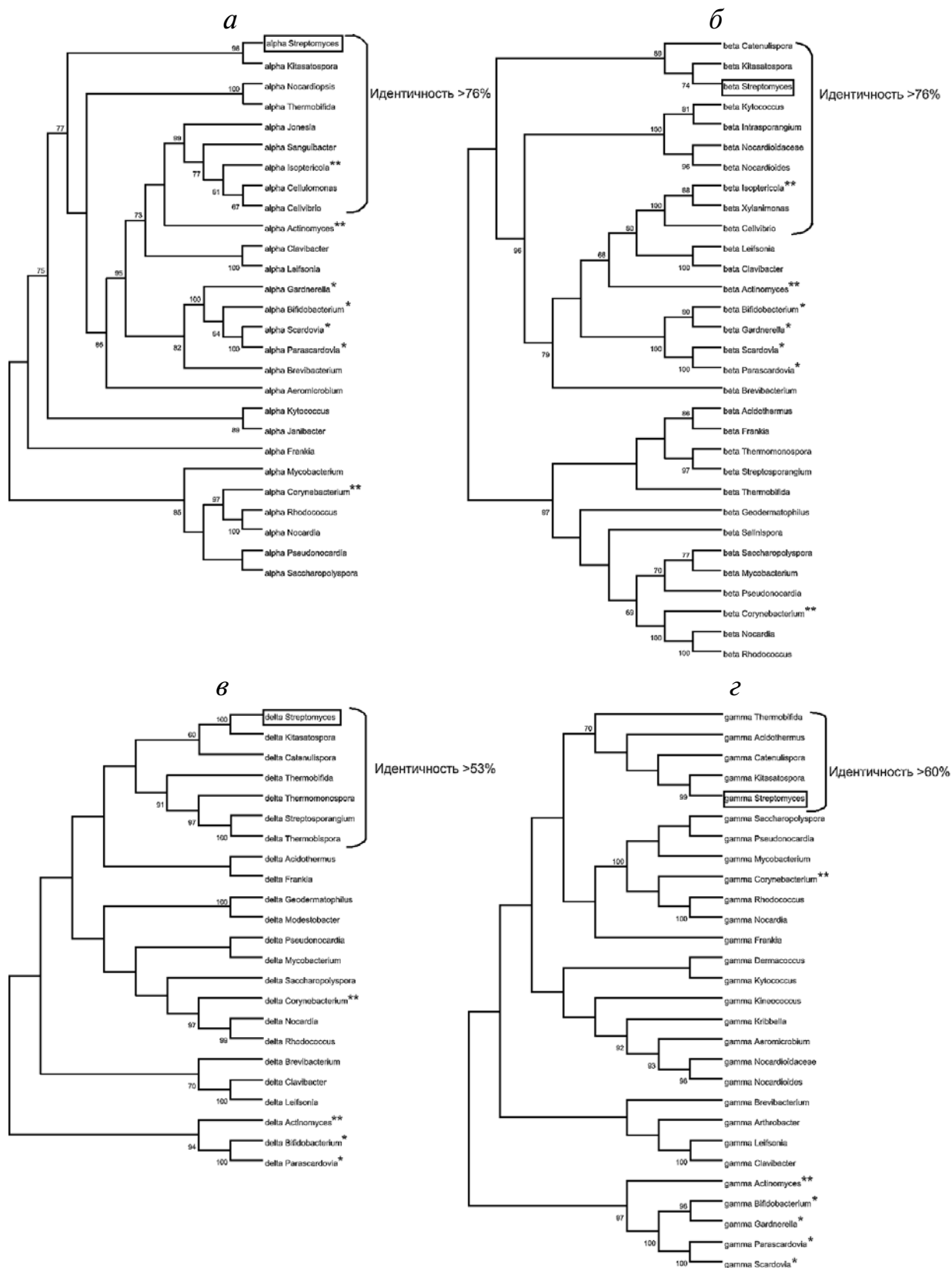


Рис. 5. Филогенетические деревья, основанные на сравнении аминокислотных последовательностей четырех субъединиц F₁-части F₀F₁-АТФ-синтазного оперона актинобактерий: *а* – α-субъединица; *б* – β-субъединица; *в* – δ-субъединица; *г* – γ-субъединица

достаточно консервативными, и выравнивание с ними идет по всей длине при идентичности 52–70%; 2) субъединицы δ и γ менее консервативны, имеют низкую гомологию (25–48%) и выравниваются не по всей длине; 3) у субъединицы ϵ из *S. fradiae* (полная длина субъединицы ϵ в среднем 121 а.о.) выравнивается участок всего в 46 а.о. с аналогичным участком из *M. tuberculosis* и *C. difficile*, и идентичность этих выравниваний составляет 43 и 35% соответственно; 4) субъединицы α , β и ϵ из *S. fradiae* либо очень плохо выравниваются с гомологами из *M. tuberculosis* и *C. difficile* (идентичность ~26%) и не по всей длине, либо сходные участки вообще отсутствуют, так, например, при прочих равных параметрах программа Blastp не выровняла вовсе аминокислотную последовательность субъединицы β из *S. fradiae* с аминокислотной последовательностью этой же субъединицы из *C. difficile*.

Известно, что связывание олигомицина А происходит только с определенными аминокислотами в с-субъединице. В табл. 6 представлены результаты сравнения олигомицин-связывающих доменов с-субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазы в олигомицин-чувствительных и устойчивых организмах, из которой видно, что по данным аминокислотам *S. fradiae* ATCC 19609 имеет наибольшее сходство с *Homo sapiens sapiens*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Впервые показано, что рекомбинантные белки γ -, β - α - и ϵ -субъединиц F_1 -части АТФазного комплекса бактерии *S. fradiae* ATCC 19609 фос-

форируются комплексом СТПК в составе клеточного экстракта. Методом двумерного электрофореза с последующим масс-спектрометрическим анализом (MALDI-TOF) впервые установлено, что во фракции мембранных везикул осуществляется фосфорилирование β - и ϵ -субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса. В обоих типах экспериментов наблюдается фосфорилирование β -субъединицы. Фосфорилирование β -субъединицы обнаружено в митохондриях эукариот [22–24], хлоропластах растений [25] и у *M. tuberculosis* [26]. Способность к фосфорилированию в одном типе экспериментов γ - и α -субъединиц, а в другом – β -субъединицы может отражать важность фосфорилирования γ - и α -субъединиц для процесса сборки F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса, а также функционирования комплекса на стадии синтеза или гидролиза АТФ. Существенными могут быть и отличия условий фосфорилирования в различных экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Протеинкиназы серин-треонинового типа присутствуют и охарактеризованы у многих бактерий, их функции многообразны, в т.ч. жизнеспособность и вирулентность у патогенных бактерий [41, 42]. В секвенированном геноме *S. fradiae* ATCC 19609 (JNAD00000000) обнаружено 30 СТПК, часть из которых является мембраносвязанными и может принимать участие в фосфорилировании F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса и сопряженных с ним белков, задействованных в энергетическом обеспечении клетки и регуляции функционирования комплекса. В последние годы F_0F_1 -АТФ-синтаза и сопряженный с ней комплекс белков бактерий и митохондрий

Таблица 6. Сравнение олигомицин-связывающих доменов с-субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазы в олигомицин-чувствительных и устойчивых организмах (табл. взята из статьи Ко с соавт. [22], с модификациями)

Микроорганизм	Олигомицин-связывающий домен в с-субъединице F_0F_1 -АТФ-синтазы		
	первое а.о.	аминокислотный сиквенс***	последнее а.о.
<i>S. fradiae</i> *	54	ILGFADFCEALALIGL	68
<i>S. lividans</i> *	54	ILGFADFCEALALIGL	68
<i>S. avermitilis</i> **	58	ILGFVLCFALALIGL	72
<i>M. tuberculosis</i> **	54	FITVGLVEAAYFINL	68
<i>C. difficile</i> **	54	LLGVVIAESSAIYGL	68
<i>H. sapiens</i> *	51	ILGFALFEAMGLFCL	65

* Организмы, чувствительные к олигомицину А.

** Организмы, устойчивые к олигомицину А.

*** Аминокислоты, участвующие в связывании с олигомицином А, выделены жирным шрифтом.

человека становятся все более пристальным объектом внимания как биомишень для создания лекарств [9, 43, 44], а также ключевым объектом исследований, поскольку нормальное функционирование данного комплекса практически важно для здоровья и продолжительности жизни человека [45–47]. Универсальная природа F₀F₁-АТФ-синтазы у всех живых организмов, включая бактерий и человека, ее роль биологического наномотора требуют детальных исследований функционирования этого комплекса у всех организмов. Углубленное понимание механизмов функционирования F₀F₁-АТФ-синтазы бактерий, роль в этом СТПК, отличия в ее структуре и работе от F₀F₁-АТФ-синтазы человека могут помочь созданию новых лекарственных препаратов. Ранее нами было показано, что штамм *S. fradiae* ATCC 19609 является сверхчувствительным к олигомицину А и его полусинтетическим производным, а также более чувствительным к целому ряду химических соединений других химических классов [17, 20]. Важно отметить тот факт, что чувствительность к олигомицину А у *S. fradiae* ATCC 19609 и *S. lividans* ТК24 повышается при ингибировании СТПК

[17, 48]. Это открывает новые возможности для создания противоактинобактериальных лекарств с синергическим действием на основе ингибиторов F₀F₁-АТФ-синтазы и СТПК. F₀F₁-АТФ-синтаза *S. fradiae* ATCC 19609 в силу сходства с-субъединицы (система транспорта протонов) с с-субъединицей F₀F₁-АТФ-синтазы человека, а также высокой чувствительности данного штамма к олигомицину А и его производным может быть удобной моделью для изучения F₀F₁-АТФ-синтазы человека.

Полученные результаты позволяют научно обосновать и расширить перспективы создания высокочувствительной тест-системы на основе штамма *S. fradiae* ATCC 19609 для отбора ингибиторов АТФ-синтаз человека и бактерий с использованием разработанных нами подходов [49, 50].

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 гг.» (государственный контракт № 02.512.12.2056 от 20 мая 2009 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Capaldi, R.A., and Aggeler, R. (2002) Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor, *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 154–160.
2. Senior, A.E. (2007) ATP synthase: motoring to the finish line, *Cell*, **130**, 220–201.
3. Watanabe, R., and Noji, H. (2013) Chemomechanical coupling mechanism of F(1)-ATPase: catalysis and torque generation, *FEBS Lett.*, **587**, 1030–1035.
4. Okuno, D., Iino, R., and Noji, H. (2011) Rotation and structure of F₀F₁-ATP synthase, *J. Biochem.*, **149**, 655–664.
5. Walker, J.E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1–16.
6. Chi, S.L., and Pizzo, S.V. (2006) Cell surface F₁F₀ ATP synthase: a new paradigm, *Ann. Med.*, **38**, 429–438.
7. Skulachev, V.P. (1999) Bacterial energetics at high pH: what happens to the H⁺ cycle when the extracellular H⁺ concentration decreases, *Novartis Found Symp.*, **221**, 200–213.
8. Ahmad, Z., Okafor, F., Azim, S., and Laughlin, T.F. (2013) ATP synthase: a molecular therapeutic drug target for antimicrobial and antitumor peptides, *Curr. Med. Chem.*, **20**, 1956–1973.
9. Lu, P., Lill, H., and Bald, D. (2014) ATP synthase in mycobacteria: special features and implications for a function as drug target, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1208–1218.
10. Gras, J. (2013) Bedaquiline for the treatment of pulmonary, multidrug-resistant tuberculosis in adults, *Drugs Today (Barcelona)*, **49**, 353–361.
11. Biukovic, G., Basak, S., Manimekalai, M.S., Rishikesan, S., Roessle, M., Dick, T., Rao, S.P., Hunke, C., and Gruber, G. (2013) Variations of subunit {varepsilon} of the *Mycobacterium tuberculosis* F₁F₀ ATP synthase and a novel model for mechanism of action of the tuberculosis drug TMC207, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 168–176.
12. Hensel, M., Deckers-Hebestreit, G., and Altendorf, K. (1991) Purification and characterization of the F₁ portion of the ATP synthase (F₁F₀) of *Streptomyces lividans*, *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1313–1319.
13. Hensel, M., Ahmus, H., and Deckers-Hebestreit, G. (1991) The ATP synthase of *Streptomyces lividans*: characterization and purification of the F₁F₀ complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1274**, 101–108.
14. Pagliarani, A., Nesci, S., and Ventrella, V. (2013) Modifiers of the oligomycin sensitivity of the mitochondrial F₁F₀-ATPase, *Mitochondrion*, **13**, 312–319.
15. Shchepina, L.A., Pletjushkina, O.Y., Avetisyan, A.V., Bakeeva, L.E., Fetisova, E.K., Izyumov, D.S., Saprunova, V.B., Vyssokikh, M.Y., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2002) Oligomycin, inhibitor of the F₀ part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis, *Oncogene*, **21**, 8149–8157.
16. Symersky, J., Osowski, D., Walters, D.E., and Mueller, D.M. (2012) Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13961–13965.
17. Алексеева М.Г., Елизаров С.М., Беккер О.Б., Любимова И.К., Даниленко В.Н. (2009) F₀F₁-АТФ-синтаза стрептомицетов: модулирование активности и чувствительности к олигомицину серин-треониновыми протеинкиназами, *Биол. мембраны*, **26**, 41–49.
18. Symersky, J., Pagadala, V., Osowski, D., Krah, A., Meier, T., Faraldo-Gomez, J.D., and Mueller, D.M. (2012) Structure of the c(10) ring of the yeast mitochondrial ATP

- synthase in the open conformation, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **19**, 485–491, S1.
19. Hong, S., and Pedersen, P.L. (2008) ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 590–641.
 20. Lysenkova, L.N., Turchin, K.F., Korolev, A.M., Dezhenkova, L.G., Bekker, O.B., Shtil, A.A., Danilenko, V.N., and Preobrazhenskaya, M.N. (2013) Synthesis and cytotoxicity of oligomycin A derivatives modified in the side chain, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 2918–2924.
 21. Lysenkova, L.N., Turchin, K.F., Korolev, A.M., Danilenko, V.N., Bekker, O.B., Dezhenkova, L.G., Shtil, A.A., and Preobrazhenskaya, M.N. (2014) Study on retroaldol degradation products of antibiotic oligomycin A, *J. Antibiot. (Tokyo)*, **67**, 153–158.
 22. Ko, Y.H., Pan, W., Inoue, C., and Pedersen, P.L. (2002) Signal transduction to mitochondrial ATP synthase: evidence that PDGF-dependent phosphorylation of the delta-subunit occurs in several cell lines, involves tyrosine, and is modulated by lysophosphatidic acid, *Mitochondrion*, **1**, 33–48.
 23. Azarashvily, T.S., Tyynela, J., Baumann, M., Evtodienko, Y.V., and Saris, N.E. (2000) Ca²⁺-modulated phosphorylation of a low-molecular-mass polypeptide in rat liver mitochondria: Evidence that it is identical with subunit c of F₀F₁-ATPase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 741–744.
 24. Hojlund, K., Wrzesinski, K., Larsen, P.M., Fey, S.J., Roepstorff, P., Handberg, A., Dela, F., Vinten, J., McCormack, J.G., Reynet, C., and Beck-Nielsen, H. (2003) Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta-subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes, *J. Biol. Chem.*, **278**, 10436–10442.
 25. Kanekatsu, M., Saito, H., Motohashi, K., and Hisabori, T. (1998) The beta subunit of chloroplast ATP synthase (CF₀CF₁-ATPase) is phosphorylated by casein kinase II, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **46**, 99–105.
 26. Prisc, S., Dankwa, S., Schwartz, D., Chou, M.F., Locasale, J.W., Kang, C.M., Bemis, G., Church, G.M., Steen, H., and Husson, R.N. (2010) Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7521–7526.
 27. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene*, **96**, 23–28.
 28. Mierendorf, R., Yeager, K., and Novy, R. (1994) Innovations, *Newsletter of Novagen*, **1**, 1–3.
 29. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000) *Practical Streptomyces genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
 30. Sambrook, J., Fritsch, E.E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 31. O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007–4021.
 32. Elizarov, S.M., and Danilenko, V.N. (2001) Multiple phosphorylation of membrane-associated calcium-dependent protein serine/threonine kinase in *Streptomyces fradiae*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **202**, 135–138.
 33. Elizarov, S.M., Mironov, V.A., and Danilenko, V.N. (2000) Calcium-induced alterations in the functioning of protein serine/threonine and tyrosine kinases in *Streptomyces fradiae* cells, *IUBMB Life*, **50**, 139–143.
 34. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680.
 35. Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment, *J. Mol. Biol.*, **302**, 205–217.
 36. Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., Jr., and Deerfield, D.W. (1997) II. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation, *EMB News*, **4**, 14.
 37. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403–410.
 38. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2731–2739.
 39. Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406–425.
 40. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, **39**, 783–791.
 41. Cousin, C., Derouiche, A., Shi, L., Pagot, Y., Poncet, S., and Mijakovic, I. (2013) Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation, *FEMS Microbiol. Lett.*, **346**, 11–19.
 42. Pereira, S.F., Goss, L., and Dworkin, J. (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **75**, 192–212.
 43. Lu, P., Villellas, C., Koul, A., Andries, K., Lill, H., and Bald, D. (2014) The ATP synthase inhibitor bedaquiline interferes with small-molecule efflux in *Mycobacterium smegmatis*, *J. Antibiot. (Tokyo)*, DOI. 10.1038/ja.2014.74.
 44. Bald, D., and Koul, A. (2013) Advances and strategies in discovery of new antibacterials for combating metabolically resting bacteria, *Drug Discov. Today*, **18**, 250–255.
 45. Plotnikov, E.Y., Morosanova, M.A., Pevzner, I.B., Zorova, L.D., Manskikh, V.N., Pulkova, N.V., Galkina, S.I., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (2013) Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants in an acute bacterial infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 3100–3108.
 46. Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Elichev, V.P., Filenko, O.F., Kalinina, N.I., Kapelko, V.I., Kolosova, N.G., Kopnin, B.P., Korshunova, G.A., Lichinitser, M.R., Obukhova, L.A., Pasyukova, E.G., Pisarenko, O.I., Roginsky, V.A., Ruuge, E.K., Senin, I.I., Severina, I.I., Skulachev, M.V., Spivak, I.M., Tashlitsky, V.N., Tkachuk, V.A., Vyssokikh, M.Y., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437–461.
 47. Skulachev, V.P. (2002) Programmed death phenomena: from organelle to organism, *Ann. NY Acad. Sci.*, **959**, 214–237.
 48. Беккер О.Б., Мавлетова Д.А., Любимова И.К., Мирончева Т.А., Штиль А.А., Даниленко В.Н. (2012) Индукция программированного лизиса культуры *Streptomyces lividans* ингибиторами серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа, *Микробиология*, **81**, 177–184.
 49. Беккер О.Б., Алексеева М.Г., Осолодкин Д.И., Палюлин В.А., Елизаров С.М., Зефилов Н.С., Даниленко В.Н. (2010) Новая тест-система для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ: *E. coli* ARHVIИ/Pk25 конструктор, *Acta Naturae*, **2**, 126–139.
 50. Елизаров С.М., Алексеева М.Г., Новиков Ф.Н., Чилив Г.Г., Маслов Д.А., Штиль А.А., Даниленко В.Н. (2012) Идентификация сайтов фосфорилирования аминокликозидфосфотрансферазы VIII *Streptomyces rimosus*, *Биохимия*, **77**, 1504–1512.

**F₀F₁-АТФ-SYNTHASE OF *Streptomyces fradiae* ATCC 19609:
STRUCTURAL, BIOCHEMICAL, AND FUNCTIONAL
CHARACTERIZATION****M. G. Alekseeva¹, T. A. Mironcheva¹, D. A. Mavletova¹,
S. M. Elizarov², N. V. Zakharevich¹, V. N. Danilenko¹**¹ *N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow 119991, Russia; fax: +7(499)132-8962, E-mail: valerid@rutenia.ru*² *A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33, corp. 2, Moscow 119071, Russia; fax: +7(495)954-2732*

Received July 22, 2014

Revision received October 27, 2014

Aiming at the mechanisms of regulation of bacterial membrane bound F₀F₁-ATP-synthase, we investigated the patterns of protein phosphorylation in inverted membrane vesicles from *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 strain. Using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, we showed for the first time that β- and b-subunits of F₀F₁-ATP-synthase in the complex undergo phosphorylation, and identified 20 proteins with known functions. All 8 subunits of F₀F₁-ATP-synthase, that is, α, β, γ, δ, ε, a, b, and c, were cloned into *Escherichia coli* and expressed as recombinant proteins. Using a crude preparation of serine/threonine protein kinases, we demonstrated the phosphorylation of recombinant γ-, β-, α-, and ε-subunits. The β-subunit was phosphorylated both as a recombinant protein and in vesicles. Differential phosphorylation of membrane bound and recombinant proteins can be attributed to different pools of protein kinases in each preparation; also, certain steps of F₀F₁-ATP-synthase assembly and function might be accompanied by individual patterns of phosphorylation. The structure of the operon containing all subunits and regulatory protein I was identified. Next, we investigated the phylogenetic similarity of *Streptomyces fradiae* ATCC19609 F₀F₁-ATP-synthase with respective proteins in saprophyte and pathogenic (including *Mycobacterium tuberculosis*) bacteria. Thus, bacterial serine/threonine protein kinases are important for regulation of F₀F₁-ATP-synthase. From the practical standpoint, our results provide the basis for design of targeted antibacterial drugs.

Key words: F₀F₁-ATP-synthase, Ser/Thr protein kinase, inverted membrane vesicles; *Streptomyces*