МИКРОБИОЛОГИЯ, 2024, том 93, № 3, с. 346–350

КРАТКИЕСООБЩЕНИЯ

УДК 579.22+579.253.4:577.151.042

ВВЕДЕНИЕ "НАТРИЕВОЙ ПОДПИСИ" В СУБЪЕДИНИЦЫ *a* И *c* ПРОТОННОЙ F-АТФазы *BACILLUS* SP. PS3 НЕ ПРИВОДИТ К ПОЯВЛЕНИЮ НАТРИЕВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

© 2024 г. С. М. Бруман[a, b, c], А. В. Литвин[d, c], А. С. Лапашина[a, b, c], Б. А. Фенюк[a, b, *]

[a]*НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия*

[b]*Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия*

[c]*ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, 119071, Россия*

[d]*Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205, Россия*

**e-mail: feniouk@belozersky.msu.ru*

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.
После доработки 14.11.2023 г.
Принята к публикации 18.11.2023 г.

У бактерий АТФаза F-типа (F-АТФаза) играет ключевую роль в биоэнергетике и сопрягает синтез/гидролиз АТФ с транспортом ионов (H^+ или Na^+) через мембрану. Ионная специфичность фермента определяется аминокислотной последовательностью субъединиц *c* и *a*. С помощью мутагенеза в ферменте термофильной бактерии *Bacillus* sp. PS3 были сделаны замены аминокислотных остатков (7 в субъединице *c* и 6 в субъединице *a*) с целью изменить ионную специфичность фермента с протонной на натриевую. Мутации не повлияли на АТФазную активность фермента, но привели к потере протонной проводимости и нарушению связывания субъединицы *a* с олигомером *c*-субъединиц, а не к изменению ионной специфичности.

Ключевые слова: роторные АТФазы, F-АТФазы, F_0F_1, ионная специфичность, трансмембранный перенос ионов, мутагенез

DOI: 10.31857/S0026365624030119

Роторные F-АТФазы прокариот расположены в плазматической мембране и сопрягают реакцию синтеза или гидролиза АТФ с трансмембранным переносом ионов H^+ или Na^+. Для синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата используется энергия трансмембранной разности электрохимических потенциалов H^+ или Na^+ ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ или $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ соответственно). При гидролизе АТФ фермент выступает в роли генератора $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ или $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$, работая как АТФ-зависимый ионный насос. F-АТФазы состоят из двух субкомплексов — расположенного в цитоплазме F_1, несущего сайты связывания нуклеотидов, и мембранного F_0, осуществляющего ионный транспорт. Ключевыми элементами F_0, непосредственно участвующими в трансмембранном переносе ионов, являются олигомерное *c*-кольцо и прилегающая к нему субъединица *a*. Каждая субъединица *c*-кольца несет сайт связывания иона, а субъединица *a* образует два несоосных полуканала, которые открываются на разные стороны мембраны и обеспечивают доступ ионов к *c*-кольцу. Перенос ионов с одной стороны мембраны на другую сопровождается вращением кольца относительно субъединицы *a* (Zubareva et al., 2020). В отсутствие *c*-кольца субкомплекс F_1 не связывается с мембраной (Schneider, Altendorf, 1985; Bietenhader et al., 2012).

Считается, что специфичность F-АТФазы к переносимому иону (H^+ или Na^+) зависит от строения сайта связывания иона на *c*-субъединице. В работе Мулкиджаняна и соавт. (Mulkidjanian et al., 2008) была предсказана "натриевая подпись" F-АТФаз — консенсусный мотив для связывания иона Na^+ *c*-субъединицей. Однако экспериментальные попытки введения "натриевой подписи" в *c*-субъединицу протонной F-АТФазы *Escherichia coli* не привели к появлению натриевой специфичности (Zhang et al., 2005). Мы предположили, что остатки субъединицы *a*, взаимодействующие с *c*-кольцом, также могут вносить вклад в ионную специфичность фермента. Анализ множественных выравниваний последовательностей субъединиц *a* и *c* из Na^+– и H^+– транслоцирующих F-АТФаз

Таблица 1. Частоты встречаемости (в %) аминокислотных остатков в позициях множественного выравнивания субъединиц *a* прокариотических F-АТФаз, построенного по данным базы COG. Нумерация остатков соответствует ферменту *Bacillus* sp. PS3. Приведены позиции, по которым проводились замены в этой работе; заменяемые остатки выделены жирным). Многоточия указывают на суммарную долю всех остальных остатков в данной позиции, помимо указанных

Переносимый ион	Позиция аминокислотного остатка в F-АТФазе *Bacillus* sp. PS3					
	*a*155	*a*165	*a*178	*a*185	*a*209	*a*211
H^+	E(67) N(14) ...(19)	S(32) A(28) G(19) ...(21)	**E(50)** H(40) D(5) ...(5)	**A(44)** L(12) I(9)...(35)	I(23) **A(20)** L(16) G(12) ...(29)	E(42) H(28) G(11) ...(19)
Na^+	**N(91)** S(6) D(3)	**S(74)** A(23) T(3)	**M(20)** T(23) G(18) A(12) ...(27)	**Y(74)** S(18) ...(8)	**Y(68)** F(14) ...(18)	**D(74)** G(23) N(3)

позволил предсказать вероятную “натриевую подпись” в *a*-субъединице (табл. 1).

Целью данной работы было проверить это предсказание. Для этого мы использовали протонную F-АТФазу *Bacillus* sp. PS3, в которой заменяли “протонные подписи” в субъединицах *a* и *c* на натриевые как одновременно, так и по отдельности.

Плазмида pTR19, кодирующая все субъединицы F-АТФазы *Bacillus* sp. PS3 (TF_0F_1-WT), была любезно предоставлена профессором Тошихару Сузуки (Токийский институт технологий, Япония) (Suzuki et al. 2002). Для введения “натриевой подписи” в субъединицы *c* и *a* было введено 13 замен: 7 в субъединицу *c* (*c*A19P, *c*N23Q, *c*V55A, *c*A57S, *c*L58T, *c*P59G, *c*I61Y) и 6 в субъединицу *a* (*a*K155N, *a*T165S, *a*E178M, *a*A185Y, *a*A209Y, *a*S211D). Экспрессируемый с этой конструкции фермент получил название TF_0F_1-Tr12. Кроме того, мы получили варианты pTR19 с теми же заменами в субъединицах *c* (кодирует фермент TF_0F_1-Tr12-*a*WT) и *a* (фермент TF_0F_1-Tr12-*c*WT) по отдельности. Для экспрессии полученных конструкций использовали штамм *E. coli* с инактивированным опероном нативной F-АТФазы (*ΔatpB-atpC*) (Datsenko, Wanner 2000). Штаммы-трансформанты использовали для получения вывернутых суббактериальных мембранных частиц (СБЧ), согласно методике Lapashina et al. (2019).

АТФазная активность сопряженных Na^+–транслоцирующих F-АТФаз в составе мембран зависит от концентрации ионов Na^+ в среде (Laubinger, Dimroth, 1987). В этой связи мы ожидали, что если бы фермент TF_0F_1-Tr12 вследствие мутаций приобрел способность к трансмембранному переносу Na^+, то его активность была бы выше в присутствии Na^+ и ниже в среде с заменой Na^+ на K^+. Мы сравнили скорости гидролиза 1 мМ АТФ в присутствии 100 мМ Na^+ или K^+ для СБЧ с рекомбинантными ферментами (табл. 2).

Однако влияние Na^+ на СБЧ с TF_0F_1-Tr-12 с “натриевой подписью” в субъединицах *c* и *a* оказалось сопоставимо с таковым для TF_0F_1-WT. Это может свидетельствовать о том, что введение мутаций в фермент не привело к появлению натриевой специфичности. В ходе дальнейшей работы мы исследовали действие мутаций на протонный транспорт. Na^+-транслоцирующие F_0F_1 способны к трансмембранному переносу протона в условиях низкой концентрации ионов натрия, поэтому эти эксперименты проводились в средах без добавления Na^+.

Чтобы непосредственно наблюдать за переносом H^+ через мембрану СБЧ, мы воспользовались красителем 9-амино-6-хлоро-2-метоксиакридином (АСМА), флуоресценция которого гасится при образовании градиента pH на мембране (Lapashina et al., 2019). Введение мутаций в мембранную часть F_0F_1 могло привести к появлению пассивной протонной проводимости через фермент. Чтобы проверить это экспериментально, к мембранным частицам добавляли субстрат дыхательной цепи сукцинат, а затем ингибитор сукцинатдегидрогеназы малонат. На рис. 1а видно, что и на СБЧ с TF_0F_1-WT, и на СБЧ с TF_0F_1-Tr-12 при

Таблица 2. АТФазная активность СБЧ *E. coli* с рекомбинантной F-АТФазой *Bacillus* sp. PS3 при комнатной температуре (мкмоль/мин на мг белка). Приведены рассчитанные из пяти повторов средние значения ± среднеквадратичные отклонения. Гидролиз АТФ регистрировали по закислению среды в присутствии pH-индикатора фенолового красного (Nishimura et al., 1962)

Фермент в составе СБЧ	Среда измерения	
	100 мМ K^+	100 мМ Na^+
TF_0F_1-WT дикого типа с “протонной подписью”	0.31 ± 0.10	0.59 ± 0.02
TF_0F_1-Tr12 с “натриевой подписью” в субъединицах *c* и *a*	0.41 ± 0.07	0.52 ± 0.09

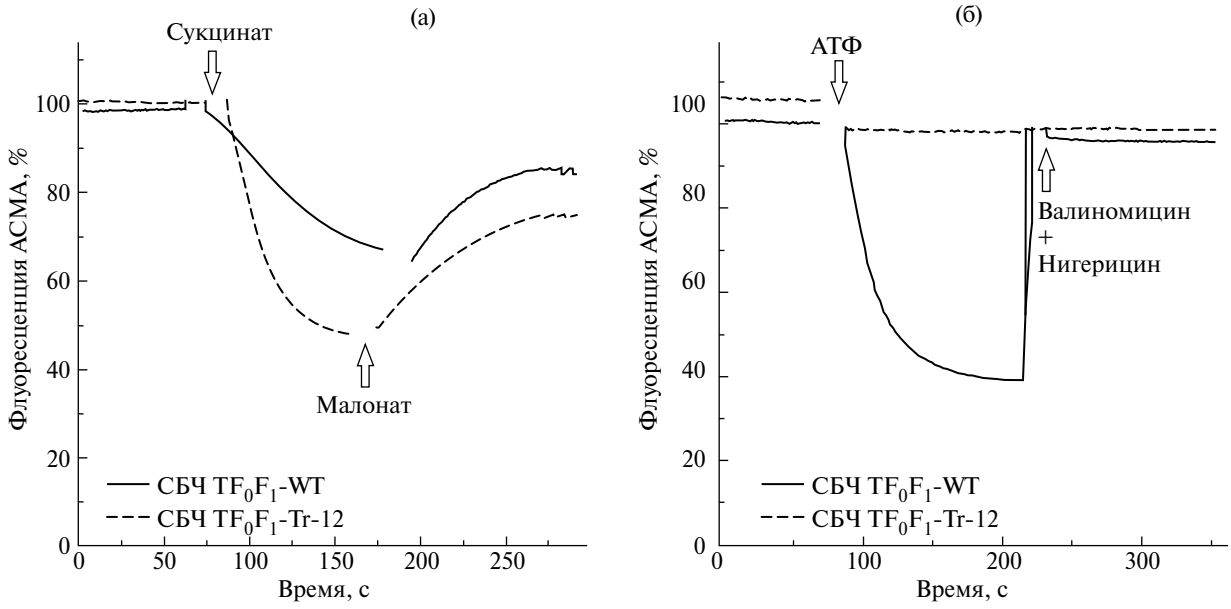

Рис. 1. Нормированная флуоресценция АСМА в присутствии мембранных частиц, содержащих TF_0F_1-WT (непрерывная кривая) или TF_0F_1-Tr-12 (прерывистая кривая). а – в кювету добавляли сукцинат натрия до 3 мМ, затем малонат натрия до 30 мМ; б – в кювету добавляли АТФ до 500 мкМ, затем смесь валиномицина и нигерицина (разобщитель) до 500 нМ каждого.

добавлении сукцината можно наблюдать гашение флуоресценции, а при добавлении малоната — ее восстановление.

Это говорит о том, что дыхательная цепь успешно генерирует градиент pH и пассивной утечки протонов через F_0-субкомплексы обеих АТФ-синтаз не происходит. Далее к СБЧ добавляли АТФ, ожидая увидеть АТФ-зависимый протонный транспорт (рис. 1б). Однако здесь гашение флуоресценции АСМА наблюдалось только на СБЧ с F_0F_1 дикого типа; последующее добавление разобщителя — смеси валиномицина и нигерицина, в присутствии которых мембрана становится проницаемой для H^+, приводило к ожидаемому возврату флуоресцентного сигнала на исходный уровень, свидетельствующему о диссипации ΔpH. Таким образом, в то время как у фермента дикого типа гидролиз АТФ сопряжен с трансмембранным транспортом H^+, в случае TF_0F_1-Tr-12 это, по-видимому, не так.

Чтобы дополнительно прояснить, почему СБЧ с TF_0F_1-Tr-12 неспособны к АТФ-зависимому формированию протонного градиента на мембране, мы измерили АТФазную активность СБЧ в присутствии 1 мМ дициклогексилкарбодиимида (DCCD) — ингибитора, который специфически ковалентно связывается с протон-переносящими остатками в составе F_0 (Fillingame, 1975) и блокирует протонный транспорт и вращение *c*-кольца (Toei, Noji, 2013). Поскольку АТФазная активность F_1 в составе интактного F_0F_1 в норме сопряжена с вращением *c*-кольца, блокировка последнего должна снижать АТФазную активность. В этом эксперименте СБЧ инкубировали с 1 мМ DCCD при 37°C в течение 3 ч; каждые 30 мин из образца отбирали аликвоту, измеряли ее АТФазную активность и сравнивали ее с активностью аналогичного контрольного образца, не содержащего DCCD. В случае СБЧ с TF_0F_1-WT уже после первых 30 мин инкубации с DCCD наблюдалось двукратное падение активности по отношению к контролю (рис. 2а).

Однако на активность СБЧ с TF_0F_1-Tr-12 инкубация с DCCD не оказала никакого влияния даже спустя 3 ч. По всей видимости, в мутантном ферменте ковалентное связывание DCCD с *c*-субъединицей не препятствует свободному вращению *c*-кольца в ответ на добавление АТФ, что свидетельствует о нарушении взаимодействия между *c*-кольцом и субъединицей *a* и объясняет неспособность мутантного фермента к трансмембранному протонному транспорту.

Чтобы более детально разобраться в причине наблюдаемых эффектов, мы выделили и очистили из СБЧ исследуемые F_0F_1-комплексы, воспользовавшись методикой (Suzuki et al., 2002). При исследовании субъединичного состава очищенных комплексов при помощи гель-электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 2б) обнаружилось, что в случае F_0F_1-Tr-12, в отличие от F_0F_1-WT, на геле не детектируется субъединица *a*. Неясно, происходит ли потеря субъединицы *a* при сборке рекомбинантного фермента в клетке *E. coli*, или же эта субъединица теряется при очистке белка. Однако очевидно, что внесение мутаций на *c-a* интерфейсе F_0 привело к дестабилизации комплекса. К сожалению, мы не видели на гелях субъединицы *c* в связи

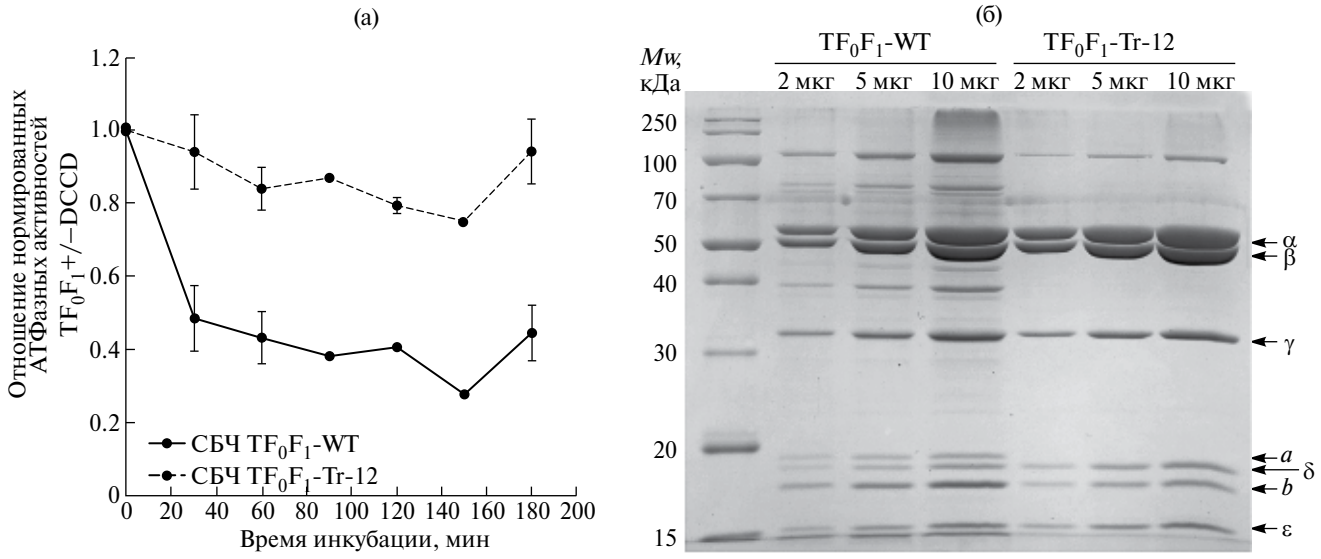

Рис. 2. а – Влияние инкубации с DCCD на АТФазную активность СБЧ с TF_0F_1-WT или TF_0F_1-Tr-12. Показаны отношения значения АТФазной активности в образце с DCCD к таковым в аналогичных контрольных образцах без DCCD. Точки, для которых показано стандартное отклонение, были воспроизведены в трех повторностях, остальные – средние, рассчитанные из двух повторов. б – субъединичный состав очищенных комплексов TF_0F_1-WT и TF_0F_1-Tr-12 (электрофорез в денатурирующих условиях в 12% полиакриламидном геле). Буквы справа указывают на отдельные субъединицы.

с ее слабым окрашиванием и с фоном детергента, однако наличие АТФазной активности в СБЧ и тот факт, что нам удалось выделить из них целый F_0F_1, говорит о нормальной сборке *c*-кольца в случае мутантной *c*-субъединицы.

Мы предположили, что F_0F_1, содержащие остатки “натриевой подписи” лишь в одной из двух исследуемых субъединиц (*c* или *a*; TF_0F_1-Tr-12-*a*WT или TF_0F_1-Tr-12-*c*WT соответственно), могут оказаться более стабильными, чем фермент, в котором замены были введены в обе субъединицы. Однако наблюдения за протонным транспортом при помощи АСМА показали, что СБЧ, содержащие такие ферменты, подобно описанным выше СБЧ с TF_0F_1-Tr-12, неспособны к АТФ-зависимой генерации протонного градиента на мембране. Анализ субъединичного состава очищенных TF_0F_1-Tr-12-*a*WT или TF_0F_1-Tr-12-*c*WT, проведенный с помощью SDS-PAGE, вновь показал отсутствие субъединицы *a*. Стоит также отметить, что АТФазная активность СБЧ с TF_0F_1-Tr-12-*a*WT (0.39 ед./мг) в присутствии 1 мМ АТФ была близка к активности частиц с TF_0F_1-WT (см. табл. 2), а активность СБЧ с TF_0F_1-Tr-12-*c*WT оказалась на порядок ниже и составила 0.04 ед./мг. Вероятно, введение “натриевой подписи” только в субъединицу *a* дестабилизирует фермент еще сильнее, чем мутагенез обеих субъединиц.

Таким образом, введение в субъединицы *a* и *c* протонной F_0F_1-АТФазы *Bacillus* sp. PS3 остатков, характерных для Na^+-зависимых F-АТФаз, не привело к появлению способности к трансмембранному переносу ионов натрия. Более того, введение этих замен как в обе субъединицы, так и по отдельности, значительно дестабилизировало фермент.

Использованный в работе подход имеет как свои плюсы, так и минусы. К первым можно отнести относительную простоту дизайна, быстроту выполнения экспериментов и убедительность данных в случае положительного результата. Однако важным минусом использованного подхода является высокий уровень риска: одновременная замена 13 аминокислотных остатков в консервативной части фермента с большой вероятностью может вызвать проблемы со сборкой и функцией, что и было обнаружено в результате нашей работы. Альтернативный подход — проведение последовательного мутагенеза отдельных остатков и выяснение их роли в процессе сборки фермента и ионном транспорте — избавлен от этого недостатка, но представляет собой работу гораздо более трудоемкую, чем данное исследование. Возможно, плодотворным окажется более тщательный анализ сочетаний конкретных аминокислотных остатков “натриевой подписи”, а не анализ частоты встречаемости каждого из них по отдельности, как было сделано в данной работе. В будущем мы планируем провести такой анализ на большем объеме бактериальных геномов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом РНФ № 21-14-00242.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bietenhader M., Martos A., Tetaud E., Aiyar R. S., Sellem C. H., Kucharczyk R., et al. Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution // PLoS Genet. 2012. V. 8. Art. e1002876.

Datsenko K. A., Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 6640–6645.

Fillingame R. H. Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive protein component of the adenosine 5′-triphosphate energy-transducing system of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1975. V. 124. P. 870–883.

Lapashina A. S., Shugaeva T. E., Berezina K. M., Kholina T. D., Feniouk B. A. Amino acid residues β139, β189, and β319 modulate ADP-inhibition in *Escherichia coli* H+-FF-ATP synthase // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. 407–415.

Laubinger W., Dimroth P. Characterization of the Na^+-stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the F_1F_0 type // Eur. J. Biochem. 1987. V. 168. P. 475–480.

Mulkidjanian A. Y., Galperin M. Y., Makarova K. S., Wolf Y. I., Koonin E. V. Evolutionary primacy of sodium bioenergetics // Biol. Direct. 2008. V. 3. Art. 13. https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-13

Nishimura M., Ito T., Chance B. Studies on bacterial photophosphorylation. III. A sensitive and rapid method of determination of photophosphorylation // Biochim. Biophys. Acta. 1962. V. 59. P. 177–182.

Schneider E., Altendorf K. All three subunits are required for the reconstitution of an active proton channel (F_0) of *Escherichia coli* ATP Synthase (F_1F_0) // EMBO J. 1985. V. 4. P. 515–518.

Suzuki T., Ueno H., Mitome N., Suzuki J., Yoshida M. F_0 of ATP synthase is a rotary proton channel: obligatory coupling of proton translocation with rotation of *c*-subunit ring // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 13281–13285.

Toei M., Noji H. Single-molecule analysis of F_0F_1-ATP synthase inhibited by *N, N*-dicyclohexylcarbodiimide // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 25717–25726.

Zhang Y., Fillingame R. H. Changing the ion binding specificity of the *Escherichia coli* H(+)-transporting ATP synthase by directed mutagenesis of subunit *c* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 87–93.

Zubareva V. M., Lapashina A. S., Shugaeva T. E., Litvin A. V., Feniouk B. A. Rotary ion-translocating ATPases/ATP synthases: diversity, similarities, and differences // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 1613–1630.

SHORT COMMUNICATIONS

Introduction of a Sodium-Binding Motif into Subunits *a* and *c* of *Bacillus* sp. PS3 Proton F-ATPase Does Not Result in Sodium Specificity of the Enzyme

S. M. Bruman[1, 2, 3], A. V. Litvin[4, 3], A. S. Lapashina[1, 2, 3], and B. A. Feniouk[1, 2, *]

[1]Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
[2]Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
[3] Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia
[4]Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia
**e-mail: feniouk@belozersky.msu.ru*

Received October 14, 2023; revised November 14, 2023; accepted November 18, 2023

Abstract—In bacteria F-type ATPase (F-ATPase) plays a key role in bioenergetics and couples ATP synthesis/hydrolysis with the transport of ions (H^+ or Na^+) across the membrane. The ion specificity of the enzyme is determined by the amino acid sequence of subunits *c* and *a*. Here, we introduced several mutations (7 in subunit *c* and 6 in subunit *a*) into F-ATPase of thermophilic bacterium *Bacillus* sp. PS3 in order to change the ion specificity of the enzyme from proton to sodium. The mutations did not affect the ATPase activity of the enzyme, but led to loss of proton conductivity and impaired the binding of subunit *a* to the *c*-subunit oligomer, rather than changed the ion specificity.

Keywords: rotary ATPases, F-ATPases, F_0F_1, ion specificity, transmembrane ion transport, mutagenesis