

УДК 577.151.644

АДФ-ИНГИБИРОВАНИЕ H^+ - F_0F_1 -АТФ СИНТАЗЫ

Обзор

© 2018 А.С. Лапашина^{1,2}, Б.А. Фенюк^{1,2*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва; электронная почта: feniouk@fbb.msu.ru

Поступила в редакцию 06.12.17

После доработки 08.06.18

H^+ - F_0F_1 -АТФ синтаза (F-АТФаза, АТФаза F-типа, F_0F_1 -комплекс) катализирует синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата в эубактериях, митохондриях, хлоропластах и некоторых архебактериях. Синтез АТФ сопряжен с транспортом протонов через мембранную часть фермента под действием протон-движущей силы, создаваемой ферментами дыхательной и фотосинтетической цепи переноса электронов. При снижении или исчезновении протон-движущей силы (де-энергизация) АТФ синтаза способна катализировать обратную реакцию, работая как АТФ-зависимый протонный насос. АТФазная активность фермента регулируется несколькими различными механизмами, из которых наиболее консервативным является неконкурентное ингибирование комплексом MgАДФ (АДФ-ингибирование). Если в каталитическом сайте оказывается АДФ в отсутствии фосфата, это может привести к конформационным изменениям, блокирующим выход АДФ и полностью инактивирующим фермент. Высвобождение прочно связанного АДФ и ре-активация АТФ синтазы может происходить под действием протон-движущей силы, причем пороговое значение для ре-активации может быть выше такового для синтеза АТФ. Кроме того, энергизация мембраны увеличивает аффинность каталитического сайта к фосфату, тем самым, снижая вероятность нахождения в сайте АДФ без фосфата и препятствуя переходу фермента в АДФ-инактивированное состояние. Помимо фосфата, некоторые соединения, в том числе, спирты, сульфит и бикарбонат, лаурилдиметиламиноксид (LDAO) и ряд других детергентов также способны ослаблять АДФ-ингибирование и увеличивать АТФазную активность фермента. В обзоре представлена информация по АДФ-ингибированию АТФ синтаз из разных организмов, обсуждается роль этого явления *in vivo* и его взаимосвязь с другими регуляторными механизмами — ингибированием АТФазной активности субъединицей ϵ и связыванием нуклеотидов в некаталитических сайтах фермента. Следует отметить, что в ферменте из *Escherichia coli* АДФ-ингибирование выражено слабо и не снижается фосфатом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АТФ синтаза, F-АТФаза, АДФ-ингибирование, регуляция, F_0F_1 .

DOI: 10.1134/S0320972518100019

H^+ - F_0F_1 -АТФ синтаза (F-АТФаза, АТФаза F-типа, митохондриальный комплекс V, F_0F_1 -комплекс, или просто F_0F_1) — мембранный мульти-субъединичный фермент, катализирующий синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет энергии трансмембранной разности электрохимического потенциала протона ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$). При этом протоны под действием $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ проходят через гидрофобную мембранную часть фермента (F_0), вызывая конформационные изменения, приводящие к синтезу АТФ в каталитической гидрофильной части (F_1). Если же $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ падает ниже порогового значения, соответствующего энергии синтеза АТФ, F_0F_1 начинает катализировать обратную реакцию и функционирует как

АТФ-зависимая протонная помпа, гидролизует АТФ и создавая $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$.

Фермент присутствует во внутренней мембране митохондрий, тилакоидной мембране хлоропластов, а также в плазматической мембране большинства эубактерий и некоторых архебактерий. F_0F_1 является одним из эволюционно древних белков, который появился еще у общего предка эубактерий и эукариот. У большинства архебактерий F_0F_1 отсутствует; его роль выполняет H^+ -АТФаза А-типа (более схожая с протон-транслоцирующими V-АТФазами эукариот, чем с F_0F_1) [1], но каталитический домен как А-, так и V-АТФаз обнаруживает высокий уровень сходства с таковым F_0F_1 [2]. В тех редких архебактериях, у которых обнаружен F_0F_1 -комплекс [3], он присутствует вместе с А-АТФазой, и, ве-

* Адресат для корреспонденции.

роятно, был приобретен в ходе горизонтального переноса генов.

F_0F_1 является консервативным белком, он имеет одинаковое строение у всех организмов. По своей форме молекула фермента напоминает собой гриб, основание ножки которого представляет собой мембранную гидрофобную часть F_0 , через которую идет протонный транспорт, а шляпка — выдающуюся над плоскостью мембраны каталитическую гидрофильную часть F_1 , несущую сайты связывания нуклеотидов и осу-

ществляющую синтез/гидролиз АТФ. Эти две части соединяются друг с другом с помощью двух «стебельков», один из которых расположен по центру молекулы, а другой — на периферии (рис. 1).

Субъединичный состав бактериальных, хлоропластных и митохондриальных ферментов различен. Простейший вариант обнаружен у большинства эубактерий, в частности, у *Escherichia coli*: каталитическая часть F_1 состоит из пяти типов субъединиц в стехиометрии $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$;

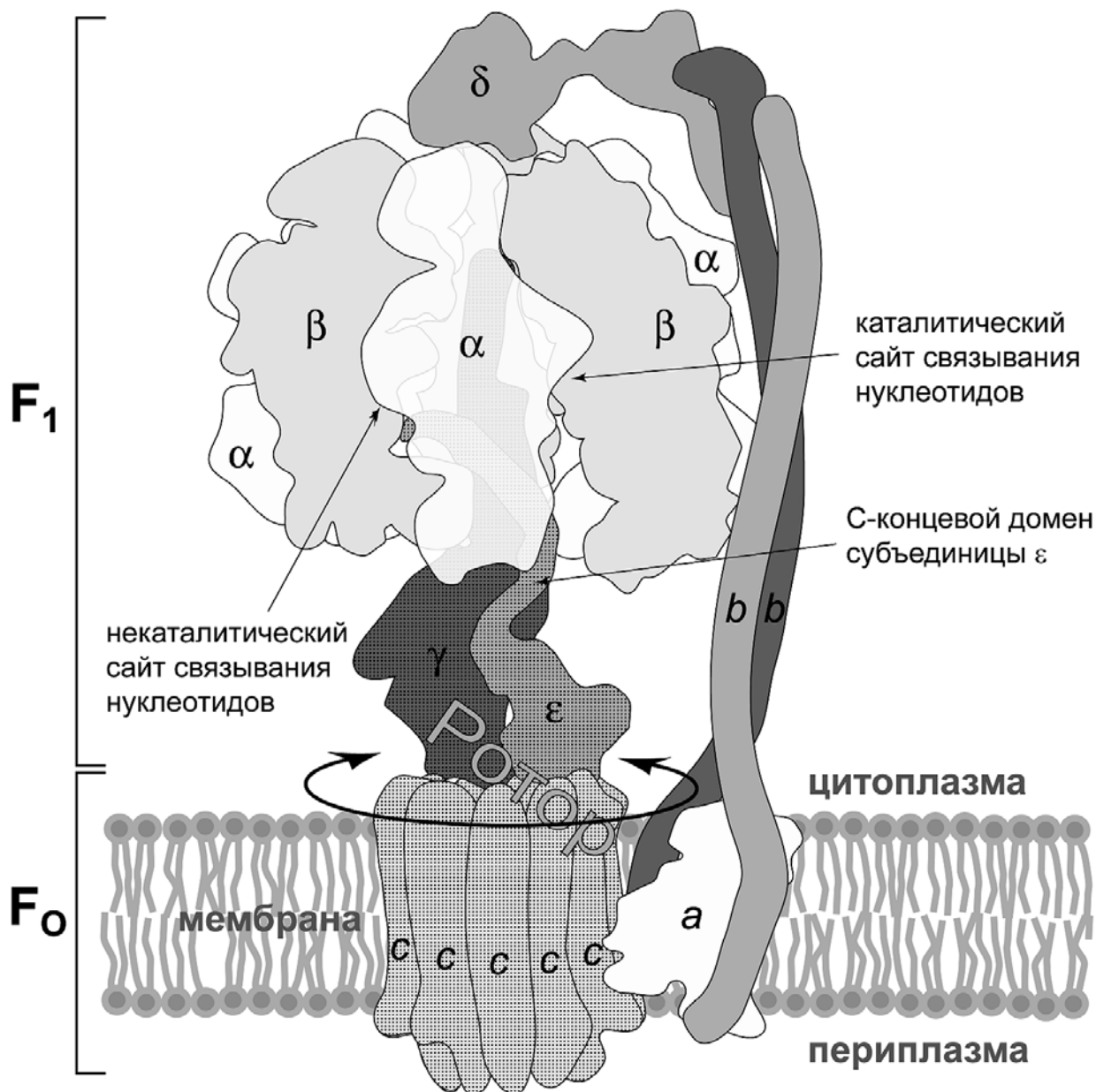


Рис. 1. Схематическое изображение F_0F_1 *E. coli* (по данным криоэлектронной микроскопии [5]). Субъединицы γ , ϵ и кольцо из 10 субъединиц образуют «ротатор» — субкомплекс, вращающийся в процессе катализа относительно других субъединиц. Ближняя к читателю субъединица α изображена полупрозрачной, чтобы показать конформацию субъединиц γ и ϵ внутри гексамера $\alpha_3\beta_3$

мембранная часть F_0 состоит из трех типов субъединиц в стехиометрии $a_1b_2c_n$, где n зависит от вида бактерии [4, 5]. Субъединицы α и β , чередуясь, подобно долькам апельсина, образуют гексамер, внутри которого расположена вытянутая часть субъединицы γ . У хлоропластов и некоторых эубактерий в F_0 вместо димера b -субъединиц присутствуют два разных белка, b и b' [6–8]. Митохондриальный фермент имеет наиболее сложный состав и состоит из более чем 15 субъединиц [9]. Однако каталитическое «ядро» ($\alpha_3\beta_3\gamma$ в F_1 и c -кольцо + субъединица a в F_0) ферментов из разных организмов имеют очень высокий уровень сходства аминокислотной последовательности и трехмерной структуры. Это дает основание распространять выводы о свойствах каталитического «ядра», полученные в экспериментах на ферменте из одного организма, на АТФ синтазы в целом.

Катализируемый F_0F_1 синтез/гидролиз АТФ сопряжен с протонным транспортом посредством ротационного механизма, подробно описанного в ряде недавних обзоров [10–12]. Транспорт протонов под действием $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ вызывает вращение кольцевого олигомера из c -субъединиц относительно субъединицы a , соединенной через субъединицу b и прочие белки периферического «стебелька» с гексамером $\alpha_3\beta_3$. Кольцевой c -олигомер соединен с субъединицами γ и ϵ (у митохондриального фермента – еще и с субъединицей δ), образующими центральный «стебелек». Благодаря такой структуре вращение c -олигомера относительно субъединицы a механически передается во вращение субъединицы γ внутри гексамера $\alpha_3\beta_3$ и вызывает конформационные изменения, результатом которых является синтез АТФ и его высвобождение из каталитических сайтов. В случае АТФазной активности фермента последовательность событий обратная.

Скорость синтеза АТФ зависит от величины $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ и для бактериальных F_0F_1 может достигать 100–250 молекул АТФ в секунду на одну молекулу фермента [13, 14], для хлоропластных и митохондриальных F_0F_1 она может превышать 400 АТФ в секунду [15, 16]. В условиях, когда $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ низка или отсутствует (де-энергизация мембраны), F_0F_1 катализирует гидролиз АТФ. Максимальная скорость гидролиза также может быть очень высока и достигать 600 и более АТФ в секунду как в случае изолированной каталитической части F_1 [17–19], так и для целого фермента [20]. Для рекомбинантного варианта F_1 АТФ синтазы митохондрий человека в опытах на единичных молекулах при 37 °С была показана скорость гидролиза более 4000 АТФ в секунду [21].

Для предотвращения бесполезного расхода АТФ клетке необходимо обеспечить работу АТФаз в

строго определенных условиях, когда гидролиз АТФ сопряжен с выполнением полезной работы, и блокировать эти ферменты в иных условиях. В случае F_0F_1 , который способен гидролизовать АТФ с большой скоростью и составляет заметную часть от общего количества мембранного белка (до 20% у митохондрий [16, 22], у бактерии *Micrococcus luteus* – до 10% [23], у кишечной палочки при нейтральном значении рН среды 3–7% [14], а при повышении рН до 9 – вдвое больше [24]), эта проблема особенно актуальна. Кроме того, в процессе сборки комплекса каталитическая часть F_1 транслируется в цитоплазме [25], и до момента ее ассоциации с мембранной частью F_0 также, вероятно, могла бы вхолостую истощать пул внутриклеточного АТФ, если бы проявляла высокую АТФазную активность. У растений существует очевидная необходимость инактивировать хлоропластный фермент в темное время, когда фотосистемы не могут генерировать $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, достаточную для синтеза АТФ. Для клеток млекопитающих экспериментально показано, что гидролиз АТФ, катализируемый F_0F_1 , играет важную роль в истощении клеточного АТФ в условиях ишемии [26–28].

В этой связи неудивительно, что АТФазная активность мембранных препаратов фермента в отсутствие $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, а также АТФазная активность изолированной каталитической части F_1 у многих организмов оказалась на порядки ниже вышеуказанных максимальных скоростей гидролиза. Более того, у фермента из хлоропластов и из некоторых бактерий АТФазная активность практически полностью отсутствует в таких образцах.

Ряд соединений (в частности, сульфиты, карбонаты, детергенты, спирты, ионы кальция) и воздействий (обработка трипсином, нагревание, кратковременная энергизация мембранных препаратов) способен многократно увеличивать АТФазную активность бактериального [29–33], хлоропластного [34–40] и митохондриального [41–45] ферментов. Механизмы активации для каждого конкретного соединения или воздействия могут быть различными, и не все они хорошо изучены. Но сам факт возможности многократного увеличения скорости гидролиза АТФ указывает, что в отсутствие вышеупомянутых соединений или воздействий АТФазная активность ингибируется у всех исследованных F_0F_1 .

МЕХАНИЗМЫ ПОДАВЛЕНИЯ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ F_0F_1

В настоящий момент известно несколько механизмов, ингибирующих АТФазную активность фермента [46].

Еще в 1963 г. в митохондриях из сердца быка был обнаружен специальный регуляторный белок IF1 [47], связывание которого с F_1 блокирует АТФазную активность F_0F_1 . При pH 8, характерном для митохондриального матрикса в нормальных условиях, этот небольшой (84 а.о.) белок, богатый лизинами и аргининами, образует тетрамер, не способный ингибировать F_0F_1 . Однако при падении pH ниже 6,5 тетрамер диссоциирует на димеры [48] и приобретает способность подавлять АТФазную активность F_0F_1 [49]. Закисление цитоплазмы и матрикса происходит в случае снижения активности ферментов дыхательной цепи (например, в состоянии ишемии) [50], когда $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ падает и F_0F_1 начинает гидролизовать АТФ. Повышение $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ при возобновлении дыхания приводит к диссоциации IF1, и фермент активируется и начинает синтез АТФ. Детали механизма ингибирования АТФ синтазы IF1 и физиологическое значение этого явления подробно освещены в многочисленных обзорных работах (например, [51, 52]).

В хлоропластном и бактериальном F_0F_1 субъединица ϵ^1 способна подавлять гидролиз АТФ. Этот небольшой белок состоит из двух доменов — N -концевой бета-бочки, контактирующей с субъединицей γ и с кольцевым олигомером c -субъединиц, и подвижного α -спирального C -концевого домена, способного изменять конформацию в зависимости от условий [53]. N -концевой домен необходим для сопряжения протонного транспорта, осуществляемого путем вращения кольца c -субъединиц относительно субъединицы a , и синтеза/гидролиза АТФ, осуществляемого посредством вращения субъединицы γ внутри $\alpha_3\beta_3$ -гексамера. Подвижный α -спиральный C -концевой домен участвует в ингибировании гидролиза АТФ: в развернутой конформации он входит внутрь $\alpha_3\beta_3$ и блокирует вращение субъединицы γ , а в свернутой конформации шпильки он не оказывает ингибирующего действия на фермент [54–57]. У некоторых бактерий субъединица ϵ способна связывать АТФ [58, 59]; при этом стабилизируется конформация шпильки и тем самым ослабляется ингибирование [60]. Подробности механизма ингибирования бактериального и хлоропластного F_0F_1 субъединицей ϵ описаны в ряде обзоров, например, [53, 61].

Субъединица γ в хлоропластном ферменте несет пару остатков цистеина, способных при окислении образовывать дисульфидный мостик,

что приводит к резкому падению скорости гидролиза АТФ [62, 63]. Благодаря этой особенности, в темноте, когда поток электронов через фотосистемы останавливается, и пул тиоредоксина окисляется, хлоропластный F_0F_1 в течение нескольких десятков минут переходит в инактивированное состояние [64]. При возобновлении освещения уже через несколько секунд происходит активация фермента путем восстановления SH-групп субъединицы γ тиоредоксином [65, 66], причем при весьма низких значениях интенсивности света (менее 1 Вт/м², т.е. на три порядка меньше, чем освещенность в солнечный день) [67]. *In vitro* восстановления SH-групп субъединицы γ можно легко достичь добавлением дитиотреитола или других восстанавливающих тиоловых реагентов.

Примечательно, что в случае хлоропластного F_0F_1 из *Arabidopsis thaliana* мутация, нарушающая данный регуляторный механизм и препятствующая инактивации фермента через окисление SH-групп субъединицы γ , не привела к сколь бы то ни было заметным негативным эффектам для растения, в том числе и при длительной инкубации в темноте [68]. Более того, парадоксальным образом у мутантного растения с «неотключаемым» гидролизом АТФ значительно уменьшалась скорость деградации фотосинтетических белков во время длительной инкубации в темноте. Таким образом, простое объяснение инактивации фермента как способа сберечь АТФ не подтвердилось экспериментально, и вопрос о физиологической роли редокс-регуляции АТФазной активности хлоропластного фермента пока остается открытым.

У бактерии *Micrococcus luteus* АТФазная активность F_0F_1 ингибируется субъединицей δ [69], первичная структура которой заметно отличается от таковой у большинства других бактерий и имеет фрагмент, гомологичный началу C -концевого ингибиторного домена субъединицы ϵ *E. coli*.

У *Paracoccus denitrificans*, представителя альфа-протеобактерий, АТФ синтаза которых обладает большим сходством с таковой митохондрий, обнаружен небольшой (11 кДа) уникальный белок ζ , ингибирующий АТФазную активность фермента [70]. При этом, как и в митохондриальном F_0F_1 , в ферменте из *P. denitrificans* субъединица ϵ не способна ингибировать гидролиз АТФ [71]. Механизм ингибирования F_0F_1 белком ζ , вероятно, сходен с таковым митохондриального IF1 и бактериальной субъединицы ϵ , несмотря на различия в структуре этих белков. Компьютерное моделирование и косвенные экспериментальные данные позволяют предположить, что α -спиральный N -концевой домен

¹ В силу исторических причин у митохондриального F_0F_1 белок, гомологичный бактериальной и хлоропластной субъединице ϵ , называется субъединицей δ и, по-видимому, не способен подавлять АТФазную активность фермента.

белка ζ входит в зазор между субъединицами α/β и субъединицей γ , тем самым блокируя вращение последней и ингибируя гидролиз АТФ [72]. Результаты рентгеноструктурного анализа также подтверждают данное предположение [73]. Гомологичные ζ белки были обнаружены в геномах других альфа-протеобактерий [71]. В свете эндосимбиотической теории происхождения митохондрий было высказано предположение, что ζ -подобный белок мог быть эволюционным предшественником митохондриального IF1; способность IF1 ингибировать АТФазную активность F_0F_1 *P. denitrificans* также является косвенным аргументом в пользу данной гипотезы [72].

Еще один вариант подавления АТФазной активности присутствует, вероятно, у F_0F_1 микобактерий. На ферменте из *Mycobacterium smegmatis* показано, что ингибирование гидролиза АТФ частично обусловлено субъединицей γ , в структуре которой присутствует дополнительная петля [8]. Делеция данной петли привела к увеличению АТФазной активности на 34%. Кроме того, недавно было обнаружено, что субъединица α фермента микобактерий также содержит дополнительный фрагмент, делеция которого увеличивает скорость гидролиза АТФ [74].

Наконец, у всех изученных на сегодняшний день F_0F_1 было обнаружено неконкурентное ингибирование АТФазной активности магниевым комплексом АДФ (АДФ-ингибирование). Этот механизм подавления гидролиза АТФ является, вероятно, самым древним и обнаруживается даже на уровне «каталитического ядра» фермента — комплекса $\alpha_3\beta_3\gamma$.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АДФ-ИНГИБИРОВАНИЯ

Если бы у F_0F_1 отсутствовало неконкурентное АДФ-ингибирование, то из термодинамических соображений, согласно которым повышение $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ сдвигает равновесие реакции от гидролиза АТФ к синтезу, следовало бы ожидать, что 1) скорость гидролиза АТФ, сопряженного с транспортом протонов, на мембранных препаратах всегда падала бы при повышении $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ (энергизация мембраны) и возрастала при его снижении или исчезновении (например, при добавке протонофоров-разобщителей); 2) повышение концентрации фосфата в среде всегда приводило бы к замедлению скорости гидролиза АТФ по причине ингибирования реакции ее продуктом.

Ниже приводится обзор ряда экспериментальных наблюдений, очевидно противоречащих этим двум пунктам, а также ключевых работ, которые

стали основой для описания и понимания АДФ-ингибирования на биохимическом уровне.

Исследования на хлоропластном F_0F_1 . Изначально АДФ-ингибирование было обнаружено у хлоропластного F_0F_1 . АТФазная активность хлоропластов в условиях де-энергизации (длительная инкубация в темноте) крайне низка. После кратковременного освещения она резко возрастает [36], но затем снова начинает снижаться и пропадает за несколько десятков секунд [75]. Следует отметить, что $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, необходимый для активации хлоропластного фермента, зависел от состояния цистеинов субъединицы γ . Если они были окислены и образовывали SS-мостик, то для активации требовался значительно более высокий уровень $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ [15].

В 1972 г. Carmelli и Lifshitz обнаружили, что АДФ (в концентрации 0,1–0,2 мМ) резко ускоряет спад АТФазной активности хлоропластов после кратковременной энергизации светом. Фосфат в концентрации 2 мМ, наоборот, поддерживал фермент в активном состоянии и препятствовал АДФ-зависимому ускорению снижения скорости гидролиза АТФ [76]. Дальнейшие эксперименты на хлоропластах показали, что при энергизации мембраны происходит высвобождение АДФ [77], количественно коррелирующее с возрастанием их АТФазной активности [78]. Последнее наблюдение, в совокупности с другими экспериментальными данными, позволило предположить, что прочно связанный АДФ ингибирует активность фермента, и его высвобождение в ответ на появление $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ и является причиной активации.

Гипотеза об ингибирующем действии АДФ получила подтверждения в экспериментах по исследованию АТФазной активности очищенного изолированного хлоропластного F_1 из гороха. Было показано, что гидролиз АТФ неконкурентным образом ингибируется $MgADP$, и что активирующее действие сульфита и спиртов связано с ослаблением этого ингибирования [39]. Кинетический анализ F_1 из шпината показал, что прочное связывание АДФ в одном каталитическом сайте сопровождается связыванием АТФ в другом, а третий каталитический сайт остается пустым [79].

В работах по изучению эффекта фосфата на гидролиз АТФ хлоропластами шпината было установлено, что фосфат препятствует прочному связыванию ингибирующего АДФ, чем, вероятно, и объясняется его способность поддерживать АТФазную активность фермента [80].

В отсутствие данных о структуре F_0F_1 было достаточно сложно установить сайт связывания ингибирующего АДФ. С помощью фотоактивируемого аналога АДФ было выяснено, что в хло-

ропластном F_1 сайт связывания ингибирующего нуклеотида находится на субъединице β , несущей каталитические сайты [81]. Позже Boyer et al. подтвердили, что АДФ-ингибирование хлоропластного F_1 вызывается связыванием $MgADP$ без фосфата в каталитическом сайте фермента [82], что совпадало с результатами экспериментов группы Kozlov et al. на митохондриальном ферменте [83].

Дополнительные штрихи к картине ингибирования хлоропластного F_0F_1 магниевым комплексом АДФ были добавлены по результатам исследований влияния азида на активность фермента. Было установлено, что азид практически не влияет на синтез АТФ и на АТФазную активность, наблюдаемую после энергизации хлоропластов. Однако если после энергизации светом измерения АТФазной активности проводились в присутствии разобшителя, ликвидирующего $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, то азид проявлял себя как сильный ингибитор гидролиза АТФ [84]. Дальнейшие эксперименты на хлоропластах шпината показали, что азид препятствует высвобождению АДФ [85, 86] и тем самым «фиксирует» АДФ-ингибированное состояние фермента. Кроме того, если азид был добавлен перед фосфатом, это приводило к полному исчезновению активирующего действия последнего. Если же фосфат добавлялся первым, то азид переставал ингибировать гидролиз АТФ [86].

Исследования на бактериальном F_0F_1 . На бактериальном F_0F_1 АДФ-ингибирование было обнаружено в экспериментах на фотосинтетических прокариотах, зачастую инициированных по аналогии с исследованиями на хлоропластах. Меландри и соавторы показали, что АТФазная активность суббактериальных инвертированных частиц (СБЧ) из фотогетеротрофной бактерии *Rhodobacter capsulatus* резко возрастала после энергизации мембран освещением, а АДФ препятствовал активации [87]. Похожая картина наблюдалась на СБЧ из другой фотогетеротрофной бактерии, *Rhodospirillum rubrum* [88], для которых также была показана активация гидролиза АТФ искусственным $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, и была высказана гипотеза о связывании АДФ как причине ингибирования фермента [89]. В более поздних экспериментах на СБЧ *Rb. capsulatus* было обнаружено, что если образец активировать энергизацией мембраны, а затем измерять АТФазную активность в присутствии разобшителя, когда гидролиз АТФ не тормозится создаваемой ферментом $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, то наблюдается инактивация F_0F_1 в течение нескольких минут. АДФ ускорял эту инактивацию, а фосфат замедлял [90]. Похожие эффекты фосфата, а также активация сульфитом, наблюдались на СБЧ *Rb. capsulatus* в более позд-

ней работе [91]. Примечательно, что при гидролизе АТФ в присутствии сульфита наблюдалось более чем десятикратное увеличение V_{max} , а K_m оставалась неизменной. Также было обнаружено, что сульфит препятствовал активации фермента $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$.

На цианобактериях наблюдаемая картина напоминала таковую на хлоропластах, за исключением модуляции активности тиоловыми соединениями (что было вполне ожидаемо, т.к. у большинства цианобактерий отсутствует характерный для хлоропластного F_1 фрагмент субъединицы γ , несущий 2 остатка цистеина и отвечающий за инактивацию фермента при образовании между ними S—S-мостика) [92]. На СБЧ из *Synechococcus* 6716 было показано, что гидролиз АТФ активируется при кратковременной энергизации мембраны светом, а затем снижается из-за связывания ингибирующего АДФ. Пороговый уровень $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, необходимый для активации цианобактериального фермента, оказался близок к таковому для восстановленного F_0F_1 хлоропластов [93]. Добавление фосфата приводило к стабилизации активированной фракции цианобактериального фермента, а сульфит был способен активировать его даже в отсутствие пре-энергизации [94].

Помимо фотосинтетических прокариот, АДФ-ингибирование было обнаружено и у других бактерий. Дозе и соавторы обнаружили, что длительная инкубация F_1 из *Micrococcus luteus* ATCC 398 с небольшим количеством АДФ приводила к подавлению его АТФазной активности. Ингибирование наблюдалось, только если в среде инкубации вместе с АДФ присутствовали ионы магния, и предотвращалось добавлением 2–5% этанола [95]. На F_1 из термофильной бактерии *Bacillus* sp. PS3 (которая, согласно результатам анализа первичной структуры субъединиц F_0F_1 , должна в современной классификации быть отнесена к роду *Geobacillus*, с наибольшим сходством к *G. thermoleovorans*) было показано, что инкубация с АДФ в присутствии магния приводит к снижению начальной АТФазной активности, не влияя на стационарную скорость реакции [96]. Если же активность очищенного от нуклеотидов фермента измерялась при низкой концентрации АТФ (50 мкМ) в АТФ-регенерирующей системе, то в кинетике гидролиза АТФ четко выделялась начальная быстрая фаза, за которой следовало снижение АТФазной активности, предположительно вызванное АДФ-ингибированием. Затем, однако, вновь наблюдался рост скорости гидролиза АТФ, обусловленный связыванием нуклеотидов с некаталитическими сайтами F_1 (подробнее о роли некаталитических сайтов в АДФ-ингибировании см.

ниже). В присутствии детергента лаурилдиметиламиноксида (LDAO) вторая, медленная фаза гидролиза АТФ исчезала [97]. Эксперименты с радиоактивным нуклеотидом на очищенном $\alpha_3\beta_3\gamma$ комплексе показали, что LDAO значительно ускоряет диссоциацию прочно связанного АДФ [98]. На $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплексе из *Bacillus* sp. PS3 было показано, что фосфат в концентрации десятков мМ увеличивает АТФазную активность, ослабляя АДФ-ингибирование [99].

Наблюдая за вращением γ -субъединицы при гидролизе 1–2 мМ АТФ на отдельных молекулах $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплекса из *Bacillus* sp. PS3, Hirono-Nara et al. отметили проявляющиеся с шагом в 120 градусов спонтанные паузы. Распределение длительности пауз хорошо описывалось двумя экспоненциальными функциями с характерными временами 1,7 и 32 с; характерное время между длинными (более 10 с) паузами составляло 22 с [100]. Частота и длительность пауз возрастали при добавлении 0,1 мМ АДФ к среде. В случае, когда АДФ добавляли до концентрации 1 мМ, вращение γ -субъединицы прекращалось совсем; когда среду освобождали от АДФ, оно возобновлялось. Детергент LDAO, препятствующий АДФ-ингибированию, сокращал длительность пауз. Авторы пришли к заключению, что эти паузы соответствуют переходу фермента в АДФ-ингибированное состояние. Было также установлено, что инактивация фермента всегда происходит в угловом положении субъединицы γ , соответствующем «каталитической паузе» — кратковременному торможению вращения, связанному с гидролизом связанного в каталитическом сайте АДФ.

Дальнейшие эксперименты по манипуляции единичными молекулами фермента из *Bacillus* sp. PS3 с помощью магнитного пинцета показали, что принудительный поворот и удерживание субъединицы γ АДФ-ингибированного $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплекса приводит к активации фермента. Вероятность активации росла с увеличением угла поворота и достигала максимальной после 40 градусов [101]. При удержании γ -субъединицы в АДФ-ингибированной конформации (в угловом положении субъединицы γ , соответствующим «каталитической паузе») активации не наблюдалось даже спустя сотни секунд. Авторы работы предположили, что активация связана с выбросом ингибиторного АДФ из каталитического центра при вращении субъединицы γ под действием внешней силы. Сходные эксперименты на $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ -субкомплексе из той же бактерии подтвердили, что и в присутствии субъединицы ϵ вращение субъединицы γ внешней силой способно активировать фермент из состояния длительной паузы [102].

В экспериментах на СБЧ из аэробной альфа-протеобактерии *Paracoccus denitrificans*, способных с высокой скоростью синтезировать АТФ, но практически не проявляющих АТФазной активности, также было показано, что энергизация мембраны и добавление фосфата приводит к активации гидролиза АТФ [103]. Дальнейшие исследования показали, что инактивация вызвана связыванием ингибирующего MgАДФ, ускоряющимся в отсутствие $\Delta\psi_{H^+}$ и замедляющимся в присутствии фосфата [104].

Исследования на митохондриальном F_0F_1 . В 1971 г. Mitchell и Moyle обнаружили, что АТФазная активность субмитохондриальных частиц печени крысы в несколько раз увеличивается в присутствии ряда анионов, в том числе фосфата, пирофосфата, бихромата, хромата, и сульфата [45]. Дальнейшие эксперименты выявили также активирующее действие сульфита и указали на наличие двух фракций фермента с различной активностью, равновесие между которыми сдвигалось в ответ на добавку активаторов или ингибиторов [105].

Роль магниевого комплекса АДФ в данном явлении была показана и подробно охарактеризована Vinogradov et al., в экспериментах на субмитохондриальных инвертированных мембранных частицах (СМЧ) из сердца быка было показано, что предварительная инкубация образца с небольшим количеством АДФ резко снижает начальную скорость гидролиза АТФ в АТФ-регенерирующей системе, однако не влияет на стационарную скорость реакции [106]. Сходные эксперименты на очищенном митохондриальном F_1 подтвердили, что именно связывание магниевого комплекса АДФ с каталитическим доменом АТФ синтазы приводит к ингибированию активности [107, 108].

В дальнейших опытах на субмитохондриальных частицах из сердца быка было установлено, что ГДФ и ИДФ не способны ингибировать F_0F_1 в той же концентрации, что АДФ, и что в присутствии АТФ ре-активация фермента в АТФ-регенерирующей системе ускоряется [109]. Если же перед измерением образец проинкубировать с АТФ-регенерирующей системой (и тем самым полностью удалить из образца АДФ), то кинетика АТФазной реакции четко разделяется на две фазы: начальную с высокой скоростью гидролиза, за которой следует более медленная, предположительно обусловленная АДФ-ингибированием [109, 110]. Азид ингибировал, а сульфит наоборот, стимулировал гидролиз АТФ во второй фазе, но ни тот, ни другой не влияли на активность в начальной фазе. Те же самые эффекты наблюдались и на очищенном митохондриальном F_1 [44]. Таким образом, было установле-

но, что для ингибирования азидом необходимо, чтобы фермент некоторое время работал, гидролизуя АТФ. Авторы предположили, что азид действовал лишь на фракцию АДФ-ингибированного F_1 , отсутствующую в начальный момент времени, но появившуюся в ходе реакции. Аналогичным образом, стимуляция гидролиза АТФ сульфитом интерпретировалась как активация фракции АДФ-ингибированного F_1 .

Предположение о механизме ингибирования азидом было подтверждено экспериментом по добавке азиды к ферменту, прединкубированному с небольшим количеством АДФ. После такой добавки АТФ-регенерирующая система уже не была способна активировать фермент, и быстрая фаза гидролиза полностью исчезала. Это однозначно доказало, что азид действует на АДФ-ингибированную форму фермента, и индуцирует прочное связывание АДФ, исключая обмен со средой, и делающее нуклеотид недоступным для АТФ-регенерирующей системы [44].

Исследования влияния $\Delta\psi_{H^+}$ на активность митохондриального F_0F_1 на СМЧ из сердца быка выявили, что энергизация мембраны препятствует АДФ-ингибированию [111]. Более того, как и в случае хлоропластов [84], энергизация мембраны ре-активировала фермент даже в присутствии азиды [112].

Наконец, в экспериментах на очищенном препарате митохондриального F_1 было показано, что АДФ-ингибирование вызвано связыванием $MgADP$ (добавленного в среду или образовавшегося в ходе гидролиза АТФ) в отсутствие фосфата в каталитическом сайте фермента, и что связывание $MgGDP$ не способно вызвать подобный эффект [83].

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В АДФ-ИНГИБИРОВАНИИ

На молекулярном уровне механизм АДФ ингибирования АТФ синтазы на сегодняшний день остается неясным, несмотря на выявление отдельных аминокислотных остатков, играющих важную роль в этом процессе. Так, в экспериментах на субкомплексе $\alpha_3\beta_3\gamma$ из термофильной бактерии *Bacillus* sp. PS3 показано, что замена треонина на серин в позиции 165 субъединицы β (область Р-петли) препятствует образованию неактивного комплекса со связанным $MgADP$ в каталитическом сайте. Мутация привела к росту стационарной АТФазной активности фермента [113]; тот же эффект наблюдался и в случае аналогичной мутации в ферменте из *E. coli* [114] и митохондрий дрожжей *Saccharo-*

myces cerevisiae [43]. Кроме того, данная мутация заметно снижала ингибирование АТФазной активности азидом. Еще более ярко описанные эффекты наблюдались при внесении этой мутации в фермент из хлоропластов одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: АТФазная активность мутантного фермента выросла в 10 раз по сравнению с белком дикого типа, чувствительность к азиду упала в 30 раз, и исчезла способность активации детергентом октилглюкозидом [115].

Следует отметить, что резкое ослабление АДФ-ингибирования путем введения мутации T168S в субъединице β в хлоропластной АТФ синтазе водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* привело к значительному увеличению скорости роста мутантного штамма в гетеротрофных условиях на ацетате как источнике энергии и углерода [115].

Еще один аминокислотный остаток, мутация по которому резко снизила степень ингибирования F_0F_1 , был обнаружен в экспериментах на ферменте из термофильной *Bacillus* sp. PS3 [116]. Замена Q259L в субъединице β привела к увеличению АТФазной активности фермента в 25 раз и к исчезновению активации LDAO. Если в случае мутации β -T168S эффект на АДФ-ингибирование мог бы объясняться изменением взаимодействия Р-петли с фосфатом в каталитическом сайте, то в случае остатка β -259, расположенного на расстоянии более 10 Å от каталитического сайта, механизм влияния замены на АДФ-ингибирование остается неясным.

Наконец, в F_1 -комплексе термоалкалифильной бактерии *Bacillus* sp. TA2.A1, АТФазная активность которого крайне низка, замена четырех положительно заряженных аминокислотных остатков в N-концевой части субъединицы γ (Lys8, Arg9, Arg10 и Arg12) на глутамины привела к 35-кратному увеличению скорости гидролиза АТФ. Кроме того, у мутанта исчез активизирующий эффект детергента LDAO. Это позволяет предположить, что замена положительно заряженных остатков привела к ослаблению АДФ-ингибирования [33].

Описаны также мутации, приводящие к усилению АДФ-ингибирования F_0F_1 . Одним из первых примеров является замена остатка аспартата в положении 261 субъединицы α на аспарагин в ферменте из термофильной бактерии *Bacillus* sp. PS3. Этот остаток расположен в некаталитических сайтах связывания нуклеотидов рядом с местом связывания иона Mg^{2+} , однако данная мутация не влияла на связывание АТФ и АДФ в некаталитических сайтах [98]. (Подробнее о роли некаталитических сайтов в АДФ-ингибировании см. ниже.) При этом на $\alpha_3\beta_3\gamma$ комплек-

се было показано, что мутация значительно уменьшает скорость гидролиза АТФ после предварительной инкубации фермента с микромолярными количествами АДФ. Без пред-инкубации свободный от АДФ мутантный фермент демонстрировал высокую начальную АТФазную активность (на уровне белка дикого типа), которая затем быстро снижалась. Добавка детергента LDAO приводила к резкому возрастанию активности мутантного белка до уровня, наблюдающегося в присутствии LDAO у фермента дикого типа. И наконец, эксперименты с радиоактивным нуклеотидом показали, что мутация препятствовала высвобождению прочно связанного АДФ [98] и тем самым, вероятно, стабилизировала АДФ-ингибированное состояние.

Так как некаталитические сайты находятся на значительном расстоянии от каталитических, прямое влияние мутации на связывание АТФ, АДФ и фосфата в каталитическом сайте представляется малореальным. Таким образом, остается предположить, что мутация каким-то образом облегчала конформационный переход фермента из промежуточного активного состояния с АДФ, связанным без фосфата в каталитическом сайте, в АДФ-ингибированное состояние.

Мутация M23K в субъединице γ фермента из фотогетеротрофной бактерии *R. capsulatus* привела к ускорению спада скорости гидролиза АТФ после активации фермента с помощью $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}}^+$ и к усилению АДФ-ингибирования. Данный эффект, вероятно, вызван взаимодействием введенного в положение $\gamma 23$ положительно заряженного остатка лизина с несущим отрицательный заряд участком DELSEED² субъединицы β [117] и стабилизацией субъединицы γ в угловом положении, соответствующем конформации, из которой фермент переходит в АДФ-ингибированное состояние [118].

РОЛЬ НЕКАТАЛИТИЧЕСКИХ САЙТОВ В АДФ-ИНГИБИРОВАНИИ F_0F_1

Субкомплекс $\alpha_3\beta_3$ содержит шесть сайтов связывания нуклеотидов, расположенных между субъединицами α и β . Три из них быстро обмениваются нуклеотидами со средой: это каталитические сайты, они представлены в основном аминокислотными остатками субъединицы β . Другие три сайта обмениваются нуклеотидами со средой медленно, расположены большей сво-

ей частью на α -субъединице, и называются некаталитическими [119]. Некаталитические сайты способны связывать как АТФ и его аналоги [120], так и АДФ (до двух молекул АДФ на молекулу фермента [121]), а также другие пуриновые нуклеотиды, их аналоги и пирогосфат (детальный обзор на тему строения и свойств некаталитических сайтов см. [122]).

Связывание АТФ в некаталитических сайтах, по-видимому, облегчает выход фермента из MgАДФ-ингибированного состояния. Так, было показано, что рост АТФазной активности ингибированного АДФ хлоропластного F_1 в АТФ-регенерирующей системе, а также выброс прочно связанного АДФ из каталитических сайтов коррелирует со связыванием АТФ в некаталитических сайтах [121, 123, 124]. То же было показано и для митохондриального F_1 [125]. При этом, по-видимому, связывание АТФ в первом некаталитическом сайте происходит быстро, но не влияет на катализ, а вторая и третья молекулы связываются медленно, но это связывание ведет к активации.

Эксперименты на хлоропластном ферменте показали, что некаталитические сайты также способны связывать оксоанионы (сульфит, борат, карбонат), и это препятствовало связыванию в них нуклеотидов. Авторы предположили, что ослабление АДФ-ингибирования этими оксоанионами может объясняться их взаимодействием с некаталитическими сайтами [126]. Дальнейшие исследования выявили, что пирогосфат, связываясь с некаталитическими сайтами, препятствует связыванию в них сульфита и гидрокарбоната и одновременно подавляет способность последних ослаблять АДФ-ингибирование [127]. Было предположено, что, если в некаталитическом сайте оказывается связан АДФ, это приводит к стабилизации АДФ-ингибированного состояния. Но когда вместе с АДФ в некаталитическом сайте связывается оксоанион, это, подобно связыванию АТФ, ослабляет АДФ-ингибирование.

Роль некаталитических сайтов в активации гидролиза была продемонстрирована и на $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплексе *Bacillus* sp. PS3 в ряде работ, где проводили мутагенез аминокислотных остатков, ответственных за связывание нуклеотидов в этих сайтах (Lys175, Thr176, Asp261 и Asp262 субъединицы α). Так, модификация одного из этих остатков (α D261N) не привела к потере способности связывать нуклеотиды в некаталитических сайтах, однако понизила скорость высвобождения АДФ из каталитических сайтов, предположительно нарушив связь первых с последними [98]. Мутантный вариант субкомплекса с заменами всех четырех функциональных ос-

² β DELSEED — высококонсервативный участок из семи аминокислот ближе к С-концу субъединицы β , названный по последовательности в однобуквенной записи; у *E. coli* образован остатками 380–386.

татков на аланин вообще не связывал нуклеотиды в некаталитических сайтах и получил название ΔNC (*non-catalytic*). АДФ-ингибирование было выражено сильнее на ΔNC -субкомплексе: на нем не обнаружилось АТФ-зависимой реактивации после инкубации с MgАДФ, а также наблюдалось очень быстрое падение скорости гидролиза в АТФ-регенерирующей системе практически до нуля [128]. В присутствии 25–100 мМ фосфата, однако, ΔNC -субкомплекс *Bacillus* sp. PS3 демонстрировал некоторую стационарную активность (до 10% активности дикого типа). Этот эффект наблюдался и на липосомах, содержащих ΔNC - F_0F_1 . Кроме того, в присутствии 25 мМ фосфата ΔNC -фермент катализировал АТФ-зависимый протонный транспорт. Таким образом, модификация некаталитических сайтов у фермента из *Bacillus* sp. PS3 не препятствуют активации гидролиза фосфатом [129].

Интересно, что полное подавление АТФазной активности в отсутствие фосфата наблюдали лишь на $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплексе с тремя дефектными некаталитическими сайтами. Субкомплексы, содержащие два или хотя бы один нормальный некаталитический сайт, оставались способными постоянно гидролизовать АТФ, хотя их стационарная АТФазная активность была тем ниже, чем большее число сайтов было мутировано [130].

Гидролиз АТФ ΔNC - $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплексом *B. subtilis* оказался очень схож с таковым у ΔNC -мутанта *Bacillus* sp. PS3: мутация мало повлияла на начальную активность, однако стационарная активность по сравнению с диким типом была крайне низка даже при добавлении LDAO [131]. Для $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплекса *B. subtilis* дикого типа было показано очень сильное ингибирующее действие MgАДФ на гидролиз АТФ; LDAO стимулировал АТФазную активность этого субкомплекса в сотни раз. Авторы предположили, что причиной такого сильного ингибирования может являться низкое сродство некаталитических сайтов к АТФ [131]. Чтобы проверить эту гипотезу, авторы заменили на триптофан один из прилежащих к некаталитическому сайту остатков α -субъединицы (Arg354Trp) и наблюдали за связыванием нуклеотидов, измеряя гашение флуоресценции этого триптофана при добавлении разных количеств АТФ к ферменту. Однако, рассчитанная из этих экспериментов кажущаяся константа связывания АТФ оказалась того же порядка, что и константа связывания АТФ в некаталитическом сайте фермента *E. coli*.

Литературные данные о влиянии связывания нуклеотидов в некаталитических сайтах F_1 из *E. coli* на его АТФазную активность неоднозначны. Некоторые исследователи утверждают,

что некаталитические сайты F_1 *E. coli* связывают нуклеотиды неодинаково: одна молекула фермента способна связать максимум две молекулы АТФ или АДФ в некаталитических сайтах, и все три сайта могут быть заполнены только смесью нуклеозид три- и дифосфатов [132]. Другая работа, напротив, продемонстрировала, что MgАТФ и MgАДФ связываются в некаталитических сайтах с очень схожими константами диссоциации (25 и 24 мкМ соответственно), одинаковыми для всех трех сайтов [133]. Что примечательно, эта же работа показала, что наличие АТФ в некаталитических сайтах не является необходимым условием для катализа, поскольку величина АТФазной активности свободного от нуклеотидов F_1 вырастает до максимальной еще до того, как соотношение фермент/(связанный в некаталитическом сайте АТФ) достигнет единицы.

Рассуждая о регуляторной роли некаталитических сайтов, стоит учесть, что концентрация адениновых нуклеотидов в живых клетках в норме находится в миллимолярном диапазоне [134], поэтому, скорее всего, в физиологических условиях некаталитические сайты всегда заполнены. Но не исключено, что при изменении отношения концентраций АДФ и АТФ в клетке изменяется и состав нуклеотидов в некаталитических сайтах, причем АДФ-ингибирование ослабляется в ответ на связывание в них АТФ.

ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТА LDAO НА АДФ-ИНГИБИРОВАНИЕ

Как уже упоминалось, некоторые детергенты способны многократно увеличивать АТФазную активность АТФ-синтаз или их субкомплексов. Одним из таких детергентов является лаурилдиметиламинооксид (LDAO). Активирующее действие этого детергента на АТФазную активность F_0F_1 нередко рассматривается как способ оценки силы АДФ-ингибирования фермента. Однако на сегодняшний день неизвестно, где находится сайт связывания LDAO, и молекулярный механизм его действия остается неясным. Ниже мы рассмотрим работы, посвященные исследованию воздействия этого детергента на активность АТФ-синтаз из разных источников.

Опосредованная LDAO стимуляция АТФазной активности впервые была обнаружена у *E. coli* на суббактериальных частицах (трехкратная активация), а также на очищенных препаратах F_0F_1 и F_1 (активация в 5–6 раз) [135]. Авторы предположили, что добавление LDAO влияет на взаимодействие субъединиц ϵ и β , однако затем эта гипотеза была подвергнута сомнению на основании результатов экспериментов по кросс-

сшивке β и ϵ в присутствии и в отсутствии LDAO [136]. Еще более высокий уровень активации (13-кратный) был отмечен для F_0F_1 , солибилизованного дигитонином [5]. Данный эффект был интерпретирован как результат ослабления ингибирующего действия субъединицы ϵ . Однако в других работах было показано активирующее действие LDAO на фермент *E. coli* и в отсутствие субъединицы ϵ , хотя степень этой активации была в несколько раз ниже [18, 137].

Стимулирующее влияние LDAO на АТФазную активность наблюдали и у других бактерий. Так, LDAO активировал гидролиз АТФ суббактериальными частицами и F_0F_1 *Rh. rubrum* (последним — в 34 раза) [138]. Степень активации менялась в зависимости от содержания магния в среде. Позже описали и LDAO-зависимую активацию F_1 и $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплекса из *Bacillus* sp. PS3 [97, 98]. Авторам этих работ удалось отчасти прояснить механизм действия LDAO на фермент в отсутствие субъединицы ϵ . Как уже было сказано, при гидролизе низких концентраций АТФ в АТФ-регенерирующей системе $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплекс, изначально не содержащий связанных нуклеотидов, демонстрирует сложную кинетику: изначально высокая активность быстро падает, поскольку появившийся в процессе гидролиза $MgADP$ ингибирует фермент, а затем гидролиз постепенно ускоряется из-за связывания АТФ в некаталитических сайтах, которое приводит к диссоциации ингибиторного $MgADP$ из каталитических ([125], см. также главу этого обзора о влиянии некаталитических сайтов на гидролиз). В присутствии LDAO не наблюдалось снижения начальной активности. Однако LDAO-активированный субкомплекс сохранял чувствительность к азиду. Авторы предположили, что LDAO либо повышает сродство некаталитических сайтов к АТФ, либо непосредственно снижает сродство каталитических сайтов к ингибиторному $MgADP$. Эксперименты с АДФ, несущим радиоактивную метку, продемонстрировали, что LDAO в присутствии АТФ ускоряет выброс ингибиторного АДФ из каталитических сайтов $\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплекса [98, 113]. Позже эта же научная группа получила и исследовала мутантный вариант $\alpha_3\beta_3\gamma$ -субкомплекса, в котором некаталитические сайты вообще не связывали нуклеотиды (ΔNC -мутант) [128]. Стационарная АТФазная активность у этого мутанта практически отсутствовала, однако при добавке LDAO наблюдался медленный гидролиз АТФ. Опыты с меченым АДФ подтвердили, что в присутствии LDAO и АТФ происходит высвобождение ингибирующего АДФ, хотя и очень медленно. Авторы статьи предположили, что если бы действие LDAO на АДФ-ингибирование было опосредо-

вано исключительно влиянием на аффинность нуклеотидов в некаталитических сайтах, то у этого мутанта не наблюдалось бы никакой активности в присутствии LDAO. Таким образом, LDAO, вероятно, влияет непосредственно на связывание нуклеотидов в каталитических сайтах.

Изучение действия LDAO на гидролиз АТФ единичными молекулами $\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплекса *Bacillus* sp. PS3 показало, что детергент сокращает длительность пауз в активности фермента, соответствующих АДФ-заингибированному состоянию фермента [100].

На хлоропластном F_1 LDAO активировал АТФазную активность в присутствии магния в 14 раз, а в присутствии кальция, наоборот, подавлял гидролиз АТФ [40]. Для митохондриальной АТФ-синтазы также описано активирующее действие LDAO. На субмитохондриальных частицах и солибилизованных детергентом Тритоном митохондриях быка наблюдали возросшую в несколько раз АТФазную активность после инкубации с LDAO [42]. Авторы статьи пытались разобраться, не связана ли LDAO-опосредованная активация с ингибированием АТФазной активности белковым фактором IF1. Однако полученные ими данные оказались противоречивы. Отмытые от IF1 субмитохондриальные частицы не активировались, а ингибировались LDAO (при инкубации с LDAO независимо от его концентрации АТФазная активность была ниже, чем вовсе без LDAO). Те же частицы, но солибилизованные Triton, активировались LDAO втрое. F_1 -субкомплекс активировался LDAO только в присутствии IF1, но величина активности никогда не достигала значений таковой без ингибитора. Еще одна работа [139] описала 5–6-кратную LDAO-зависимую активацию митохондриального F_1 картофеля.

Суммируя сказанное выше, можно заключить, что LDAO-опосредованная активация АТФазной активности наблюдается и у бактериальных, и у митохондриальных, и у хлоропластных АТФ синтаз. Механизм воздействия LDAO на фермент в точности неизвестен и, по-видимому, затрагивает сразу несколько регуляторных путей. Во-первых, LDAO ускоряет выброс ингибиторного $MgADP$ из каталитического сайта фермента, предположительно, повышая сродство некаталитических сайтов к АТФ. Кроме того, LDAO способен противодействовать ингибированию АТФазной активности белковыми факторами (субъединицей ϵ у бактерий и, вероятно, фактором IF1 в митохондриях). Важно отметить, что активирующее влияние LDAO не связано с диссоциацией F_1 -субкомплекса от F_0 .

СХЕМА АДФ-ИНГИБИРОВАНИЯ F_0F_1 И ЕГО ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ РОЛЬ *in vivo*

Роль $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ в активации F_0F_1 , ингибированного АДФ. Если фермент уже находится в состоянии АДФ-ингибирования, энергизация мембраны способна привести к открытию сайта с прочно связанным АДФ, выходу нуклеотида и ре-активации фермента [104, 140, 141]. Вероятным объяснением активирующего действия энергизации мембраны на фермент в состоянии АДФ-ингибирования является выброс прочно связанного в каталитическом сайте АДФ в результате вращения кольцевого олигомера c -субъединиц вместе с субъединицей γ под действием $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. Эта гипотеза подтверждается и результатами экспериментов на единичных молекулах F_1 из *Bacillus* sp. PS3, в которых происходила активация АДФ-ингибированного фермента при вращении субъединицы γ под действием искусственно приложенной силы [101, 102]. Следует отметить, что значение силы, необходимой для поворота субъединицы γ и активации фермента, было выше, чем значение силы, которую активный фермент мог развить за счет гидролиза АТФ. Это означает, что необходимый для активации F_0F_1 из *Bacillus* sp. PS3 уровень $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, вероятно, превышает таковой для синтеза АТФ [102]. Аналогичный вывод был сделан Юнге по результатам экспериментов на хлоропластном ферменте [142].

Роль $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ -зависимого связывания фосфата в предотвращении АДФ-ингибирования. На основании литературных данных, значительная часть которых описана выше, а также по результатам первых экспериментов на ферменте из *Rb. capsulatus* с мутацией M23K в субъединице γ [118], была предложена гипотеза, объясняющая, каким образом $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ может предотвращать АДФ-ингибирование [143]. Ряд экспериментов на хлоропластах [144], бактериях [87, 90, 104], и митохондриях [112] показал, что после активации высокой $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, для поддержания АТФазной активности фермента также требуется энергизация мембраны, хотя и на значительно меньшем уровне (при высоком уровне $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ гидролиз АТФ блокируется термодинамически). Энергозависимый выброс ингибирующего АДФ из каталитического сайта не мог обуславливать наблюдаемый эффект, т.к. необходимый для поддержания АТФазной активности уровень $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ был ниже, чем необходимо для синтеза АТФ. Более того, в ряде вышеперечисленных работ единственным генератором $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ был сам F_0F_1 , т.е. фермент поддерживал собственное активное состояние за счет АТФ-зависимого транспорта протонов через мембрану.

Наша гипотеза [143] заключалась в том, что предотвращение АДФ-ингибирования F_0F_1 в присутствии $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ может быть реализовано посредством $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ -зависимого повышения сродства каталитического сайта к фосфату. Сам факт повышения аффинности к фосфату свободного каталитического сайта в присутствии $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ был хорошо известен [145–147]; предполагалось, что это повышение аффинности является одним из двух энергозависимых этапов при синтезе АТФ [148]. Ослабление АДФ-ингибирования в присутствии фосфата также было документировано для F_0F_1 хлоропластов [76, 80], бактерий [90, 99] и митохондрий [105]. Мы предположили, что увеличение аффинности и повышение вероятности связывания фосфата в свободном каталитическом сайте будет приводить к снижению вероятности АДФ-ингибирования фермента, так как оно требует связывания MgАДФ в отсутствие фосфата. Дальнейшие эксперименты на ферменте из *Bacillus* sp. PS3 [149] и из *P. denitrificans* [150] подтвердили эту гипотезу.

Таким образом, $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ способна влиять на активность пула F_0F_1 двумя способами: 1) активировать фермент в состоянии АДФ-ингибирования, индуцируя вращение субъединицы γ и выброс прочно связанного АДФ из каталитического сайта, и 2) предотвращать АДФ-ингибирование активного фермента путем увеличения аффинности каталитического сайта к фосфату (рис. 2).

В случае умеренной де-энергизации падение сродства к фосфату увеличивает вероятность нахождения в каталитическом сайте АДФ без фосфата, тем самым повышая вероятность АДФ-ингибирования и снижая количество активных ферментов в мембране. Инактивация все большей фракции F_0F_1 будет снижать протонную проводимость мембраны и (при условии, что активность первичных генераторов $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ остается неизменной) приводить к повышению $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, тем самым уменьшая вероятность ингибирования оставшихся активных F_0F_1 . В случае же возрастания активности первичных генераторов и роста $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ выше уровня, необходимого для синтеза АТФ, будет происходить выброс ингибирующего АДФ из каталитического сайта инактивированных ферментов. В результате фракция активных F_0F_1 будет расти, повышая протонную проводимость мембраны и снижая $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ до уровня синтеза АТФ.

Следует отметить, что вышеприведенная схема хорошо согласуется с экспериментальными результатами, полученными на ферментах хлоропластов, митохондрий и большинства бактерий, однако не подходит для описания свойств F_0F_1 из *E. coli*.

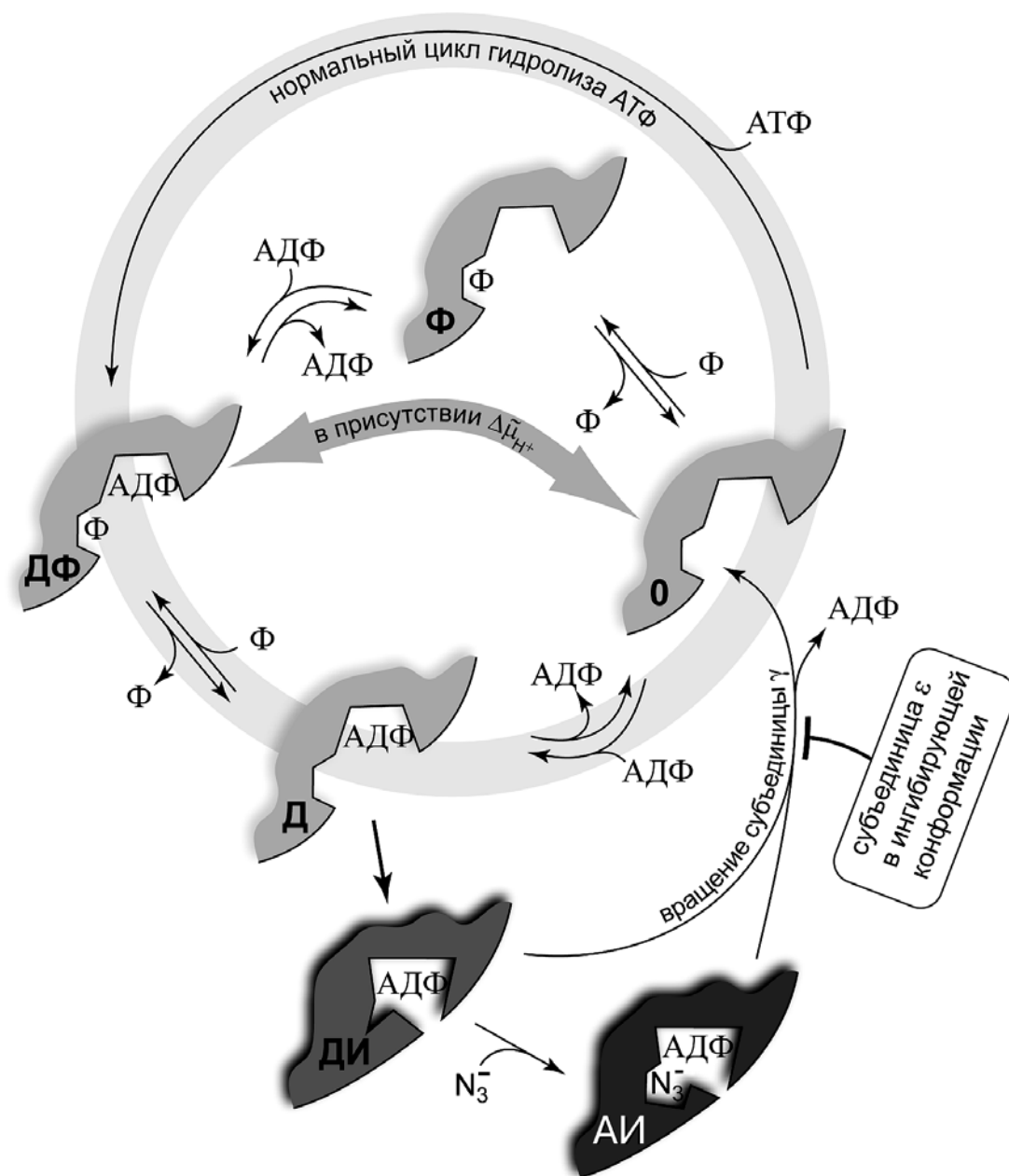


Рис. 2. Схема АДФ-ингибирования гидролиза АТФ, катализируемого F_0F_1 . Изображен один из трех каталитических сайтов фермента (0 — пустой; Ф — со связанным фосфатом; Д — со связанным АДФ; ДФ — со связанным АДФ и фосфатом; ДИ — в состоянии АДФ-ингибирования с прочно связанным АДФ без фосфата; АИ — в состоянии ингибирования азидом). В присутствии $\Delta\mu_{H^+}$ аффинность сайта к фосфату возрастает, и вероятность нахождения фосфата в каталитическом сайте увеличивается. Активация фермента из состояния АДФ-ингибирования происходит в результате вращения субъединицы γ под действием $\Delta\mu_{H^+}$. У хлоропластного и части бактериальных F_0F_1 субъединица ϵ в ингибирующей конформации стабилизирует угловое положение субъединицы γ и препятствует этой активации

АДФ-ИНГИБИРОВАНИЕ F_0F_1 ИЗ *E. coli*

АДФ-ингибирование у фермента из *E. coli* выражено слабее, чем у остальных охарактеризованных на сегодняшний день АТФ синтаз. В 1992 г. Senior et al. попытались обнаружить АДФ-ингибирование на очищенном F_1 из *E. coli* [151]. В работе сравнивались свойства отмытого от нуклео-

тидов фермента и нативного F_1 , содержавшего ~0,8 АДФ на молекулу фермента. Эксперименты показали, что свойства обоих образцов не различаются, и характерные для АДФ-ингибирования лаг и последующее нарастание АТФазной активности практически не наблюдались. Авторы пришли к выводу, что у фермента отсутствует АДФ-ингибирование и логически связа-

ли этот вывод с тем, что F_0F_1 кишечной палочки обычно работает как АТФ-зависимый генератор $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, и ингибирование этой активности нецелесообразно. Явление активации фермента в присутствии детергентов при этом объяснялось подавлением ингибирующего действия субъединицы ϵ . Однако в более ранней работе Dunn et al. было показано, что LDAO также активирует и лишенный субъединицы ϵ F_1 из *E. coli* на 140% [18].

Чуть позже Cross et al. предположили, что АДФ-ингибирование все же присутствует у F_1 из *E. coli*, однако оно замаскировано из-за субъединицы ϵ . В экспериментах на ферменте, лишенном этой субъединицы, при гидролизе крайне низких концентраций АТФ (50 нМ!) в образцах, предварительно инкубированных с MgАДФ (20 нМ), наблюдался лаг. Этот лаг исчезал после инкубации образца в АТФ-регенерирующей системе. Также было показано, что азид фиксирует ингибирующий АДФ в каталитическом сайте, а сульфит наоборот, приводит к полной диссоциации АДФ [132]. Также показано, что на комплексе $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ из *E. coli* добавка 40 мМ сульфита вызывала повышение скорости гидролиза 4 мМ АТФ (в присутствии 10 мМ Mg^{2+}) в 3,8 раза, а добавление субъединицы ϵ уменьшало стимуляцию активности более чем вдвое [152].

Измерения АТФазной активности F_1 из *E. coli* в АТФ-регенерирующей системе при концентрациях АТФ (4,4 мкМ – 3,7 мМ) показали, что инкубация фермента с MgАДФ приводила к ингибированию гидролиза АТФ, а также что активация в процессе протекания реакции связана не только с диссоциацией субъединицы ϵ [153].

На протеолипосомах, содержащих F_0F_1 *E. coli*, было показано, что в присутствии АДФ и фосфата кратковременная энергизация значительно повышала АТФазную активность фермента. Однако в отсутствии АДФ и фосфата энергизация мембраны не влияла на последующую активность, а скорость гидролиза АТФ была близка к максимальным значениям, наблюдавшимся после активации в присутствии АДФ и фосфата [154]. В опытах на инвертированных суббактериальных частицах из *E. coli* было обнаружено, что в условиях стационарного гидролиза в присутствии АДФ и фосфата де-энергизация мембраны разобщителем приводит к падению АТФазной активности. При этом в отсутствии АДФ де-энергизация увеличивала скорость гидролиза АТФ, как и ожидалось из соображений термодинамики [149].

Эксперименты на единичных молекулах комплекса $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ из *E. coli* показали, что при гидролизе АТФ вращение субъединицы γ прерывается короткими (1–1,5 с) паузами, в ходе

которых субъединица γ останавливается в угловом положении, соответствующем «каталитической паузе» [155], как и в случае фермента из *Bacillus* sp. PS3 [100]. Однако, в отличие от фермента термофильной бациллы, у комплекса $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ из *E. coli* не обнаруживались длинные (более 10 с) паузы, и суммарная фракция активных ферментов была значительно выше таковой в случае F_1 из *Bacillus* sp. PS3. Влияние АДФ на характеристики пауз фермента из *E. coli* не было исследовано, поэтому, хотя авторы предполагают их причиной АДФ-ингибирование [155], прямых доказательств этому предположению пока нет.

Еще одной важной отличительной чертой АДФ-ингибирования F_0F_1 *E. coli* является, видимо, отсутствие активирующего эффекта фосфата. Более того, в опытах по изучению встроенного в липосомы фермента в присутствии АДФ фосфат не препятствовал АДФ-ингибированию, а усиливал его: добавка АДФ до 100 мкМ снижала скорость гидролиза АТФ примерно в 4 раза, а та же концентрация АДФ на фоне 10 мМ фосфата – в 40 раз [154]. Дальнейшие исследования на инвертированных суббактериальных мембранных частицах подтвердили, что фосфат не ослабляет, а усиливает АДФ-ингибирование F_0F_1 из *E. coli*. При гидролизе 25 мкМ АТФ ингибирующий эффект АДФ был больше в присутствии 1 мМ фосфата. И наоборот, фосфат, добавленный до концентрации 3 мМ, подавлял гидролиз АТФ в пять раз в присутствии около 1 мкМ АДФ, но не оказывал заметного эффекта на АТФазную активность в отсутствии АДФ [156]. Вышеприведенные данные указывают, что у F_0F_1 *E. coli* фосфат уже в суб-миллимолярных концентрациях подавляет гидролиз АТФ, и этот эффект обусловлен усилением АДФ-ингибирования и не наблюдается в отсутствии АДФ.

Таким образом, в отличие от F_0F_1 из митохондрий, хлоропластов и большинства эубактерий, у фермента кишечной палочки АДФ-ингибирование выражено относительно слабо, и фосфат не противодействует АДФ-ингибированию, а усиливает его. Пока остается неясным, связано ли это с иным молекулярным механизмом конформационных изменений в ферменте, обуславливающих АДФ-ингибирование, или с наличием дополнительного регуляторного сайта связывания фосфата. С эволюционной точки зрения, такое отличие может быть связано с тем, что в близких к анаэробным условиям экологической ниши кишечной палочки F_0F_1 работает как АТФ-зависимый протонный насос и генерирует $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, необходимую для вращения жгутика, ионного транспорта и т.п. Если бы АДФ-ингибирование *E. coli* было бы столь же выражено,

как у аэробных и фотосинтетических бактерий, и активация фермента требовала бы более высокого уровня $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$, то инактивация фермента комплексом MgADP была бы необратимой, т.к. основным генератором $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ *E. coli* в анаэробных условиях является сам F_0F_1 .

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ АДФ-ИНГИБИРОВАНИЕМ И ИНГИБИРОВАНИЕМ, ОПОСРЕДОВАННЫМ СУБЪЕДИНИЦЕЙ ϵ

В опытах на единичных молекулах $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ -комплекса из цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus* было установлено, что при ингибировании фермента субъединицей ϵ угловое положение субъединицы γ совпадает с таковым в состоянии АДФ-ингибирования и «каталитической паузы» [157]. Эксперименты с единичными молекулами $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ -комплекса из термофильной бактерии *Bacillus* sp. PS3 дали тот же результат и показали, что при низких концентрациях АТФ (200 нМ) субъединица ϵ в 6 раз продлевает время, которое фермент проводит в АДФ-ингибированном состоянии, но не влияет на вероятность ингибирования активного фермента [158]. Следует, однако, отметить, что эксперименты на единичных молекулах комплекса $\alpha_3\beta_3\gamma$ из *Bacillus* sp. PS3, в которых Фестеровский резонансный перенос энергии (FRET) между флуоресцентными метками, введенными в субъединицы β , использовался для определения конформации фермента в состоянии каталитической паузы и паузы в ожидании АТФ, указывают на обратное. Согласно результатам этих экспериментов, структура фермента с субъединицей ϵ в вытянутой ингибирующей конформации соответствует не каталитической паузе, а паузе ожидания АТФ [159]. Причины данного противоречия неясны; разрешить его, вероятно, могли бы дополнительные эксперименты с помощью FRET в присутствии субъединицы ϵ .

В экспериментах по манипуляции единичными молекулами фермента было показано, что если $\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплекс в состоянии АДФ-ингибирования активировать путем механического вращения субъединицы γ , то активация происходит при меньшем угле поворота и требует приложения меньшей силы, чем в случае $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ -комплекса [102]. Роль субъединицы ϵ в стабилизации ингибированного состояния фермента и затруднению активации наблюдалась также и на рекомбинантном F_0F_1 из *Bacillus* sp. PS3 в инвертированных мембранах *E. coli*. Активация гидролиза АТФ в ответ на энергизацию мембраны сукцинатом наблюдалась на ферменте с лишен-

ной С-концевого ингибиторного домена субъединицей ϵ , но отсутствовала у F_0F_1 дикого типа. Генерируемой $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ было достаточно, чтобы вывести фермент без ϵ -ингибирования из инактивированного состояния, но не хватало, чтобы активировать F_0F_1 с нормальной субъединицей ϵ [149]. Эксперименты на $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ -комплексе из *E. coli* показали, что добавление субъединицы ϵ также увеличивает длительность остановки вращения субъединицы γ в положении «каталитической паузы» [155].

Вышеприведенные данные хорошо согласуются с результатами экспериментов на ферменте из *Bacillus* sp. PS3, показавшими, что замена кислых, отрицательно заряженных остатков участка $\beta\text{DELSEED}$ на аланины привела к исчезновению способности субъединицы ϵ ингибировать АТФазную активность $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ -комплекса *Bacillus* sp. PS3. Тот же эффект наблюдался при замене на аланины положительно заряженных остатков в С-концевом ингибиторном домене субъединицы ϵ . Таким образом, механизм ингибирования АТФазной активности фермента *Bacillus* sp. PS3, вероятно, реализуется посредством электростатического взаимодействия между положительно заряженными остатками С-концевого домена субъединицы ϵ и отрицательно заряженными остатками участка $\beta\text{DELSEED}$ [160]. В пользу данного предположения говорят результаты экспериментов по мутагенезу в ферменте из термоалкалифильной бактерии *Bacillus* sp. TA2.A. Замена положительно заряженных остатков в С-концевом домене субъединицы ϵ на аланины резко ослабило ее ингибирующий эффект [33].

Следует отметить, что участок $\beta\text{DELSEED}$ очень консервативен и обнаруживается у F_0F_1 из подавляющего большинства организмов, в том числе и в митохондриальном ферменте. Богатый положительно заряженными аминокислотами мотив AXLAL(R/K)RAXXR в С-концевом домене субъединицы ϵ также достаточно консервативен и обнаруживается у фермента из ряда бактерий (в том числе рода *Bacillus*) и у хлоропластного F_0F_1 , но отсутствует у фермента *E. coli*, альфа-протеобактерий и митохондрий [53]. Это позволяет предположить, что электростатическое взаимодействие, объясняющее ингибирующее действие субъединицы ϵ фермента *Bacillus* sp. PS3, играет ту же функцию в F_0F_1 ряда бактерий и хлоропластов, но оставляет открытым вопрос о молекулярном механизме ингибирующего действия субъединицы ϵ фермента *E. coli*.

Анализ структуры фермента указывает, что взаимодействие субъединицы ϵ с $\beta\text{DELSEED}$ предположительно стабилизирует субъединицу γ в угловом положении, соответствующем АДФ-

ингибированию. Примечательно, что взаимодействие с β DELSEED положительного заряда лизина-23 в субъединице γ в мутанте γ M23K, в котором АДФ-ингибирование значительно усиливается, также, вероятно, стабилизирует это же угловое положение субъединицы γ в F_1 из *Rb. capsulatus* и *E. coli* [19, 118].

Следует отметить, что описанных результатов недостаточно, чтобы определить, какое из двух явлений является первичным событием — АДФ-ингибирование или ингибирование субъединицей ϵ . Также нельзя утверждать, что субъединица ϵ усиливает АДФ-ингибирование — это могут быть независимые события, и конформации инактивированного фермента могут отличаться в том и в другом случае. Однако на наш взгляд, наиболее вероятной является гипотеза [143], согласно которой в живой клетке АДФ-ингибирование является первичным событием, приводящим к остановке вращения субъединицы γ , а С-концевой домен субъединицы ϵ дополнительно стабилизирует угловое положение субъединицы γ и повышает энергетический барьер для ее вращения, необходимого для ре-активации. В недавно опубликованной структуре комплекса F_1 из теромалкалифильной бактерии *C. thermarum*, закристаллизованного в присутствии АДФ, субъединица ϵ находилась в свернутой конформации, не оказывающей ингибирующего действия. Это было интерпретировано как указание на вторичную роль субъединицы ϵ в процессе инактивации фермента [161].

Отсутствие влияния субъединицы ϵ на частоту возникновения пауз во вращении субъединицы γ комплекса $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ из *E. coli* при гидролизе АТФ и увеличение длительности этих пауз в присутствии субъединицы ϵ [155] также согласуется с предположением о первичной роли АДФ-ингибирования в инактивации фермента.

Также следует отметить, что у F_0F_1 из *Bacillus* sp. PS3, при оптимальной для этого термофильного организма температуре $\sim 60^\circ\text{C}$, субъединица ϵ принимает ингибирующую конформацию с вытянутым С-концевым доменом лишь при концентрации АТФ менее 200 мкМ, а для комплекса F_1 этот порог был еще ниже и составлял 30 мкМ. При этом концентрация АДФ не оказывала заметного влияния на конечное состояние субъединицы ϵ , как в F_0F_1 , так и в F_1 , хотя увеличение концентрации АДФ несколько замедляло скорость конформационного перехода субъединицы ϵ [55]. Для бактериальной клетки нормальный уровень внутриклеточного АТФ составляет 3–10 мМ [134], что как минимум на порядок больше вышеприведенных значений. Это означает, что *in vivo* ингибирующий эффект субъединицы ϵ у *Bacillus* sp. PS3 начинает играть

заметную роль только в условиях истощения пула АТФ, когда отношение АТФ/АДФ внутри клетки падает от нормальных значений порядка 10–20 [134] до уровня 0,05 и ниже. В таких условиях АТФазная активность F_0F_1 практически полностью подавлена, и большинство молекул фермента, вероятно, уже находится в состоянии АДФ-ингибирования.

Альтернативная гипотеза взаимосвязи между АДФ-ингибированием и конформационными переходами субъединицы ϵ была выдвинута Kato-Yamada et al. Основой для нее стали результаты экспериментов на единичных молекулах $\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплекса из *Bacillus* sp. PS3 с мутантной формой субъединицы ϵ , не способной связывать АТФ, и потому способной сохранять ингибирующую вытянутую конформацию при концентрациях АТФ вплоть до 200 мкМ даже при комнатной температуре. В этих экспериментах было показано, что в присутствии мутантной субъединицы ϵ характерное время жизни активного состояния фермента сокращалось почти в 10 раз при гидролизе 20 мкМ АТФ, а характерное время жизни инактивированного фермента не зависело от присутствия субъединицы ϵ [162], в противоположность эффекту, наблюдавшемуся в ответ на добавку нативной субъединицы ϵ на ферменте из *E. coli* [155]. Кроме того, было показано, что добавление мутантной субъединицы ϵ к $\Delta\text{NC-}\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплексу несколько увеличивало его АТФазную активность в присутствии 50 мкМ АТФ [162].

Дальнейшие исследования на $\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплексе из *B. subtilis* показали, что добавление субъединицы ϵ не влияет на его АТФазную активность при концентрациях АТФ выше 200 мкМ, и стимулирует ее в несколько раз при более низких концентрациях АТФ [163]. Таким образом, $\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплекс из *B. subtilis*, вероятно, значительно отличается от F_1 и F_0F_1 из *Bacillus* sp. PS3, для которой было показано, что при гидролизе 50 мкМ АТФ субъединица ϵ значительно ингибирует АТФазную активность [164].

Кроме того, мутантный фермент *B. subtilis* с субъединицей ϵ , зафиксированной с помощью дисульфидной связи в ингибирующей вытянутой конформации, гидролизует 2 мМ АТФ во много раз быстрее фермента дикого типа. При этом детергент LDAO на 2 порядка стимулировал стационарную АТФазную активность $\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплекса дикого типа, но не оказывал стимулирующего действия на мутантный фермент [163]. На основании вышеописанных данных Kato-Yamada et al. предположили, что субъединица ϵ в вытянутой конформации ослабляет АДФ-ингибирование. Кроме того, было предположено, что ингибирующее действие субъединицы ϵ не

требует в качестве необходимого предварительного условия АДФ-ингибирования фермента. Последнее предположение подтверждается также способностью субъединицы ϵ принимать ингибиторную конформацию в F_1 из *Bacillus* sp. PS3 в присутствии LDAO [165].

Дальнейшие эксперименты, в первую очередь — на F_0F_1 из *B. subtilis* в составе мембранных частиц, необходимы для выяснения взаимосвязи между АДФ ингибированием и конформационными переходами субъединицы ϵ .

В частности, необходимо уточнить влияние сульфат-аниона на исследуемые явления, т.к. эксперименты Kato-Yamada et al. и соавторов на $\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплексе из *B. subtilis*, в отличие от подавляющего большинства упомянутых в данном обзоре опытов, проводились в присутствии более 50 мМ сульфата, способного связываться вместо фосфата в каталитическом сайте фермента [166–168]. На митохондриальном F_1 показано, что сульфат ингибирует АТФазную активность при низких (менее 1 мМ) концентрациях АТФ и стимулирует при высоких (4 мМ) [169]. Вполне вероятно, что сульфат оказывает значительное влияние как на характеристики АДФ-ингибирования, так и на конформационные переходы субъединицы ϵ в ферменте из *B. subtilis*.

Следует также отметить, что в экспериментах на $\alpha_3\beta_3\gamma$ -комплексе из *E. coli* Duncan et al. обнаружили, что субъединица ϵ затрудняет ингибирование фермента азидом [170]. При этом эффект отсутствовал в случае субъединицы ϵ с кросс-сшивкой в С-концевого домене, препятствующей переходу последнего в вытянутое ингибирующее состояние, или если добавлялась субъединица ϵ , вовсе лишенная С-концевого домена. Так как азид действует на F_1 в состоянии АДФ-ингибирования, авторы предположили, что механизмы подавления гидролиза АТФ субъединицей ϵ и АДФ-ингибированием различны и конкурируют между собой. Дальнейшие исследования АТФазной активности F_0F_1 из *E. coli* в присутствии АДФ могли бы прояснить этот вопрос.

* * *

АДФ-ингибирование является самым консервативным из механизмов подавления АТФазной активности F_0F_1 в условиях де-энергизации мембраны. Каким образом реализуется АДФ-ингибирование на молекулярном уровне, и какова

его взаимосвязь с другими регуляторными механизмами фермента, на сегодняшний день неясно. Однако конечным результатом работы всех вышеупомянутых вариантов подавления АТФазной активности является полное «выключение» молекулы фермента, причем вероятность этого «выключения» растет по мере снижения $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. Ре-активация из выключенного состояния возможна, но требует $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ выше, чем нужно для синтеза АТФ. В таком случае весьма вероятно, что лишь некоторая (возможно, не очень большая) фракция присутствующих в сопрягающей мембране молекул F_0F_1 находятся в активном состоянии и синтезируют АТФ. Величина этой активной фракции будет зависеть от уровня $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, и чем выше он будет подниматься, тем больше молекул АТФ синтаз будут активироваться. Таким образом, пул F_0F_1 может гибко и точно подстраиваться под скорость работы первичных генераторов $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$.

У кишечной палочки и, весьма вероятно, у других бактерий, у которых основной физиологической функцией F_0F_1 является не синтез АТФ, а поддержание $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ за счет гидролиза АТФ, АДФ-ингибирование, вероятно, выражено слабее, и пороговое значение $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ для активации понижено. Кроме того, фосфат не препятствует АДФ-ингибированию F_0F_1 *E. coli* $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ -зависимым образом, а наоборот, усиливает АДФ-ингибирование.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект 14-14-00128 «Молекулярные механизмы преобразования энергии при бактериальном окислительном фосфорилировании»).

Благодарности

Авторы благодарят анонимных рецензентов за ценные замечания при написании обзора.

Вклад авторов

Авторы внесли одинаковый вклад в представленную работу.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gruber, G., Manimekalai, M.S.S., Mayer, F., and Muller, V. (2014) ATP synthases from archaea: the beauty of a molecular motor, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 940–952.
- Mulkidjanian, A.Y., Makarova, K.S., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (2007) Inventing the dynamo machine: the evolution of the F-type and V-type ATPases, *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 892–899.
- Sumi, M., Yohda, M., Koga, Y., and Yoshida M. (1997) F₀F₁-ATPase genes from an archaeobacterium, *Methanosarcina barkeri*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **241**, 427–433.
- Foster, D.L., and Fillingame, R.H. (1982) Stoichiometry of subunits in the H⁺-ATPase complex of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2009–2015.
- Sobti, M., Smits, C., Wong, A.S., Ishmukhametov, R., Stock, D., Sandin, S., and Stewart, A.G. (2016) Cryo-EM structures of the autoinhibited *E. coli* ATP synthase in three rotational states, *Elife*, **5**, e21598.
- Cozens, A.L., and Walker, J.E. (1987) The organization and sequence of the genes for ATP synthase subunits in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301, *J. Mol. Biol.*, **194**, 359–383.
- Borghese, R., Turina, P., Lambertini, L., and Melandri, B.A. (1998) The atpIBEXF operon coding for the F₀ sector of the ATP synthase from the purple nonsulfur photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *Arch. Microbiol.*, **170**, 385–388.
- Hotra, A., Suter, M., Biukovic, G., Ragunathan, P., Kundu, S., Dick, T., and Gruber, G. (2016) Deletion of a unique loop in the mycobacterial F-ATP synthase γ subunit sheds light on its inhibitory role in ATP hydrolysis-driven H⁺ pumping, *FEBS J.*, **283**, 1947–1961.
- Liu, S., Charlesworth, T.J., Bason, J.V., Montgomery, M.G., Harbour, M.E., Fearnley, I.M., and Walker, J.E. (2015) The purification and characterization of ATP synthase complexes from the mitochondria of four fungal species, *Biochem. J.*, **468**, 167–175.
- Stewart, A.G., Laming, E.M., Sobti, M., and Stock, D. (2014) Rotary ATPases-dynamic molecular machines, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **25**, 40–48.
- Watanabe, R. (2013) Rotary catalysis of FoF₁-ATP synthase, *Biophysics*, **9**, 51–56.
- Junge, W., and Nelson, N. (2015) ATP synthase, *Annu. Rev. Biochem.*, **84**, 631–657.
- Slooten, L., and Vandenbranden, S. (1989) ATP-synthesis by proteoliposomes incorporating *Rhodospirillum rubrum* F₀F₁ as measured with firefly luciferase: dependence on $\Delta\psi$ and $\Delta\mu\text{H}$, *Biochim. Biophys. Acta*, **976**, 150–160.
- Etzold, C., Deckers-Hebestreit, G., and Altendorf, K. (1997) Turnover number of *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase for ATP synthesis in membrane vesicles, *Eur. J. Biochem.*, **243**, 336–343.
- Junesch, U., and Graber, P. (1987) Influence of the redox state and the activation of the chloroplast ATP synthase on proton-transport-coupled ATP synthesis/hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **893**, 275–288.
- Matsuno-Yagi, A., and Hatefi, Y. (1988) Estimation of the turnover number of bovine heart F₀F₁ complexes for ATP synthesis, *Biochemistry*, **27**, 335–340.
- Mueller, D.M. (1988) Arginine 328 of the beta-subunit of the mitochondrial ATPase in yeast is essential for protein stability, *J. Biol. Chem.*, **263**, 5634–5639.
- Dunn, S.D., Tozer, R.G., and Zadorozny, V.D. (1990) Activation of *Escherichia coli* F₁-ATPase by lauryldimethylamine oxide and ethylene glycol: relationship of ATPase activity to the interaction of the epsilon and beta subunits, *Biochemistry*, **29**, 4335–4340.
- Sekiya, M., Nakamoto, R.K., Al-Shawi, M.K., Nakanishi-Matsui, M., and Futai, M. (2009) Temperature dependence of single molecule rotation of the *Escherichia coli* ATP synthase F₁ sector reveals the importance of γ - β subunit interactions in the catalytic dwell, *J. Biol. Chem.*, **284**, 22401–22410.
- Ishmukhametov, R.R., Galkin, M.A., and Vik, S.B. (2005) Ultrafast purification and reconstitution of His-tagged cysteine-less *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1706**, 110–116.
- Suzuki, T., Tanaka, K., Wakabayashi, C., Saita, E.-I., and Yoshida, M. (2014) Chemomechanical coupling of human mitochondrial F₁-ATPase motor, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 930–936.
- Penin, F., Deleage, G., Godinot, C., and Gautheron, D.C. (1986) Efficient reconstitution of mitochondrial energy-transfer reactions from depleted membranes and F₁-ATPase as a function of the amount of bound oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), *Biochim. Biophys. Acta*, **852**, 55–67.
- Munoz, E., Salton, M.R.J., Ng, M.H., and Schor, M.T. (1969) Membrane adenosine triphosphatase of *Micrococcus lysodeikticus*: purification, properties of the «soluble» enzyme and properties of the membrane-bound enzyme, *Eur. J. Biochem.*, **7**, 490–501.
- Gonzales-Siles, L., Karlsson, R., Kenny, D., Karlsson, A., and Sjoling, A. (2017) Proteomic analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in neutral and alkaline conditions, *BMC Microbiol.*, **17**, 11.
- Ruhle, T., and Leister, D. (2015) Assembly of F₁F₀-ATP synthases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 849–860.
- Grover, G.J., Atwal, K.S., Sleph, P.G., Wang, F.-L., Monshizadegan, H., Monticello, T., and Green, D.W. (2004) Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F₁F₀-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **287**, H1747–1755.
- Rouslin, W., Erickson, J.L., and Solaro, R.J. (1986) Effects of oligomycin and acidosis on rates of ATP depletion in ischemic heart muscle, *Am. J. Physiol.*, **250**, H503–508.
- Jennings, R.B., Reimer, K.A., and Steenbergen, C. (1991) Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **23**, 1383–1395.
- 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.
- Lynn, W.S., and Straub, K.D. (1969) ADP kinase and ATPase in chloroplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 540–547.
- Bakels, R.H.A., van Walraven, H.S., van Wielink, J.E., van der Zwetdegraaff, I., Krenn, B.E., Krab, K., Berden, J.A., and Kraayenhof, R. (1994) The effect of sulfite on the ATP hydrolysis and synthesis activity of membrane-bound H⁺-ATP synthase from various species, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 487–492.
- Pacheco-Moises, F., Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and Garcia, J.J. (2002) Sulfite inhibits the F₁F₀-ATP synthase and activates the F₁F₀-ATPase of *Paracoccus denitrificans*, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **34**, 269–278.
- Keis, S., Stocker, A., Dimroth, P., and Cook, G.M. (2006) Inhibition of ATP hydrolysis by thermoalkaliphilic F₁F₀-ATP synthase is controlled by the C-terminus of the epsilon subunit, *J. Bacteriol.*, **188**, 3796–3804.
- Du, Z.Y., and Boyer, P.D. (1990) On the mechanism of sulfite activation of chloroplast thylakoid ATPase and the rela-

- tion of ADP tightly bound at a catalytic site to the binding change mechanism, *Biochemistry*, **29**, 402–407.
35. Larson, E.M., and Jagendorf, A.T. (1989) Sulfite stimulation of chloroplast coupling factor ATPase, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 67–77.
 36. Avron, M. (1962) Light-dependent adenosine triphosphatase in chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2011–2017.
 37. Yu, F., and McCarty, R.E. (1985) Detergent activation of the ATPase activity of chloroplast coupling factor 1, *Arch. Biochem. Biophys.*, **238**, 61–68.
 38. Farron, F., and Racker, E. (1970) Mechanism of the conversion of coupling factor 1 from chloroplasts to an active ATPase, *Biochemistry*, **9**, 3829–3836.
 39. Mal'yan, A.N. (1981) Chloroplasts ATPase (CF1): allosteric regulation by ADP and Mg^{2+} ions, *Photosynthetica*, **15**, 474–483.
 40. Ren, H.M., and Allison, W.S. (1997) Photoinactivation of the F_1 -ATPase from spinach chloroplasts by dequalinium is accompanied by derivatization of methionine beta183, *J. Biol. Chem.*, **272**, 32294–32300.
 41. Ebel, R.E., and Lardy, H.A. (1975) Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions, *J. Biol. Chem.*, **250**, 191–196.
 42. Vazquez-Laslop, N., and Dreyfus, G. (1986) Mitochondrial H^+ -ATPase activation by an amine oxide detergent, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7807–7810.
 43. Mueller, D.M. (1989) A mutation altering the kinetic responses of the yeast mitochondrial F_1 -ATPase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 16552–16556.
 44. Vasilyeva, E.A., Minkov, I.B., Fitin, A.F., and Vinogradov, A.D. (1982) Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite, *Biochem. J.*, **202**, 15–23.
 45. Mitchell, P., and Moyle, J. (1971) Activation and inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by various anions and other agents, *J. Bioenerg.*, **2**, 1–11.
 46. Feniouk, B.A., and Yoshida, M. (2008) Regulatory mechanisms of proton-translocating $F(0)F(1)$ -ATP synthase, *Results Probl. Cell Differ.*, **45**, 279–308.
 47. Pullman, M.E., and Monroy, G.C. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **238**, 3762–3769.
 48. Cabezon, E., Butler, P.J., Runswick, M.J., and Walker, J.E. (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F_1 -ATPase inhibitor protein, IF1, by pH, *J. Biol. Chem.*, **275**, 25460–25464.
 49. Panchenko, M.V., and 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 Lett.*, **184**, 226–230.
 50. Rouslin, W., and Broge, C.W. (1989) Regulation of mitochondrial matrix pH and adenosine 5'-triphosphatase activity during ischemia in slow heart-rate hearts. Role of P_i/H^+ symport, *J. Biol. Chem.*, **264**, 15224–15229.
 51. Garcia-Bermudez, J., and Cuezva, J.M. (2016) The ATPase inhibitory factor 1 (IF1): a master regulator of energy metabolism and of cell survival, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1167–1182.
 52. Campanella, M., Parker, N., Tan, C.H., Hall, A.M., and Duchon, M.R. (2009) IF(1): setting the pace of the $F(1)F(0)$ -ATP synthase, *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 343–350.
 53. Feniouk, B.A., Suzuki, T., and Yoshida, M. (2006) The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of F_0F_1 -ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 326–338.
 54. Suzuki, T., Murakami, T., Iino, R., Suzuki, J., Ono, S., Shirakihara, Y., and Yoshida, M. (2003) F_0F_1 -ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance, *J. Biol. Chem.*, **278**, 46840–46846.
 55. Feniouk, B.A., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., and Suzuki, T. (2010) Conformational transitions of subunit epsilon in ATP synthase from thermophilic *Bacillus* PS3, *Biophys. J.*, **98**, 434–442.
 56. Tsunoda, S.P., Rodgers, A.J., Aggeler, R., Wilce, M.C., Yoshida, M., and Capaldi, R.A. (2001) Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F_1F_0 ATP synthase provide a ratchet action to regulate this rotary motor enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6560–6564.
 57. Nowak, K.F., and McCarty, R.E. (2004) Regulatory role of the C-terminus of the epsilon subunit from the chloroplast ATP synthase, *Biochemistry*, **43**, 3273–3279.
 58. Kato-Yamada, Y., and Yoshida, M. (2003) Isolated epsilon subunit of thermophilic F_1 -ATPase binds ATP, *J. Biol. Chem.*, **278**, 36013–36016.
 59. Kato-Yamada, Y. (2005) Isolated epsilon subunit of *Bacillus subtilis* F_1 -ATPase binds ATP, *FEBS Lett.*, **579**, 6875–6878.
 60. Kato, S., Yoshida, M., and Kato-Yamada, Y. (2007) Role of the epsilon subunit of thermophilic F_1 -ATPase as a sensor for ATP, *J. Biol. Chem.*, **282**, 37618–37623.
 61. Nakanishi-Matsui, M., Sekiya, M., and Futai, M. (2016) ATP synthase from *Escherichia coli*: mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 129–140.
 62. Hisabori, T., Sunamura, E.-I., Kim, Y., and Konno, H. (2013) The chloroplast ATP synthase features the characteristic redox regulation machinery, *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 1846–1854.
 63. Ort, D.R., and Oxenburgh, K. (1992) *In situ* regulation of chloroplast coupling factor activity, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **43**, 269–291.
 64. Kramer, D.M., and Crofts, A.R. (1989) Activation of the chloroplast ATPase measured by the electrochromic change in leaves of intact plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **976**, 28–41.
 65. McKinney, D.W., Buchanan, B.B., and Wolosiuk, R.A. (1978) Activation of chloroplast ATPase by reduced thioredoxin, *Phytochemistry*, **17**, 794–795.
 66. Dann, M.S., and McCarty, R.E. (1992) Characterization of the activation of membrane-bound and soluble CF1 by thioredoxin, *Plant Physiol.*, **99**, 153–160.
 67. Kramer, D.M., Wise, R.R., Frederick, J.R., Alm, D.M., Hesketh, J.D., Ort, D.R., and Crofts, A.R. (1990) Regulation of coupling factor in field-grown sunflower: a redox model relating coupling factor activity to the activities of other thioredoxin-dependent chloroplast enzymes, *Photosynth. Res.*, **26**, 213–222.
 68. Kohzuma, K., Froehlich, J.E., Davis, G.A., Temple, J.A., Minhas, D., Dhingra, A., Cruz, J.A., and Kramer, D.M. (2017) The role of light-dark regulation of the chloroplast ATP synthase, *Front. Plant Sci.*, **8**, 1248.
 69. Gruber, G., Godovac-Zimmermann, J., and Nawroth, T. (1994) ATP synthesis and hydrolysis of the ATP-synthase from *Micrococcus luteus* regulated by an inhibitor subunit and membrane energization, *Biochim. Biophys. Acta*, **1186**, 43–51.
 70. Morales-Rios, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernandez, G., Rodriguez-Zavala, J.S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., and Garcia-Trejo, J.J. (2010) A novel 11-kDa inhibitory subunit in the F_1F_0 ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related alpha-proteobacteria, *FASEB J.*, **24**, 599–608.
 71. Zarco-Zavala, M., Morales-Rios, E., Mendoza-Hernandez, G., Ramirez-Silva, L., Perez-Hernandez, G., and Garcia-Trejo, J.J. (2014) The ζ subunit of the F_1F_0 -ATP

- synthase of α -proteobacteria controls rotation of the nanomotor with a different structure, *FASEB J.*, **28**, 2146–2157.
72. Garcia-Trejo, J.J., Zarco-Zavala, M., Mendoza-Hoffmann, F., Hernandez-Luna, E., Ortega, R., and Mendoza-Hernandez, G. (2016) The inhibitory mechanism of the ζ subunit of the F_1F_0 -ATPase nanomotor of *Paracoccus denitrificans* and related α -proteobacteria, *J. Biol. Chem.*, **291**, 538–546.
 73. Morales-Rios, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., and Walker, J.E. (2015) Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 13231–13236.
 74. Ragunathan, P., Sielaff, H., Sundararaman, L., Biukovic, G., Subramanian Manimekalai, M.S., Singh, D., Kundu, S., Wohland, T., Frasch, W., Dick, T., and Gruber, G. (2017) The uniqueness of subunit α of mycobacterial F-ATP synthases: An evolutionary variant for niche adaptation, *J. Biol. Chem.*, **292**, 11262–11279.
 75. Petrack, B., Craston, A., Sheppy, F., and Farron, F. (1965) Studies on the hydrolysis of adenosine triphosphate by spinach chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **240**, 906–914.
 76. Carmeli, C., and Lifshitz, Y. (1972) Effects of Pi and ADP on ATPase activity in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 86–95.
 77. Strotmann, H., and Bickel-Sandkotter, S. (1977) Energy-dependent exchange of adenine nucleotides on chloroplast coupling factor (CF1), *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 126–135.
 78. Shoshan, V., and Selman, B.R. (1979) The relationship between light-induced adenine nucleotide exchange and ATPase activity in chloroplast thylakoid membranes, *J. Biol. Chem.*, **254**, 8801–8807.
 79. Mal'yan, A.N., and Vitseva, O.I. (1990) Kinetic analysis of ADP- and Mg^{2+} -dependent inactivation of CF1-ATPase, *Photosynthetica*, **24**, 613–622.
 80. Dunham, K.R., and Selman, B.R. (1981) Interactions of inorganic phosphate with spinach coupling factor 1. Effects on ATPase and ADP binding activities, *J. Biol. Chem.*, **256**, 10044–10049.
 81. Czarnecki, J.J., Dunham, K.R., and Selman, B.R. (1985) Photoaffinity labeling of the tight ADP binding site of the chloroplast coupling factor one (CF1): the effect on the CF1-ATPase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **809**, 51–56.
 82. Zhou, J.M., Xue, Z.X., Du, Z.Y., Melese, T., and Boyer, P.D. (1988) Relationship of tightly bound ADP and ATP to control and catalysis by chloroplast ATP synthase, *Biochemistry*, **27**, 5129–5135.
 83. Drobinskaya, I.Y., Kozlov, I.A., Murataliev, M.B., and Vulfson, E.N. (1985) Tightly bound adenosine diphosphate, which inhibits the activity of mitochondrial F_1 -ATPase, is located at the catalytic site of the enzyme, *FEBS Lett.*, **182**, 419–424.
 84. Wei, J., Howlett, B., and Jagendorf, A.T. (1988) Azide inhibition of chloroplast ATPase is prevented by a high protonmotive force, *Biochim. Biophys. Acta*, **934**, 72–79.
 85. Larson, E.M., Umbach, A., and Jagendorf, A.T. (1989) Sulfite-stimulated release of [3H] ADP bound to chloroplast thylakoid ATPase, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 78–85.
 86. Minkov, I.B., and Strotmann, H. (1989) The effect of azide on regulation of the chloroplast H^+ -ATPase by ADP and phosphate, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 7–12.
 87. Melandri, B.A., Baccarini-Melandri, A., and Fabbri, E. (1972) Energy transduction in photosynthetic bacteria. IV: light-dependent ATPase in photosynthetic membranes from *Rhodospseudomonas capsulata*, *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 383–394.
 88. Edwards, P.A., and Jackson, J.B. (1976) The control of the adenosine triphosphatase of *Rhodospirillum rubrum* chromatophores by divalent cations and the membrane high energy state, *Eur. J. Biochem.*, **62**, 7–14.
 89. Slooten, L., and Nuyten, A. (1981) Activation-deactivation reactions in the ATPase enzyme in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta*, **638**, 305–312.
 90. Turina, P., Rumberg, B., Melandri, B.A., and Graber, P. (1992) Activation of the $H(+)$ -ATP synthase in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *J. Biol. Chem.*, **267**, 11057–11063.
 91. Cappellini, P., Turina, P., Fregni, V., Melandri, B.A. (1997) Sulfite stimulates the ATP hydrolysis activity of but not proton translocation by the ATP Synthase of *Rhodobacter capsulatus* and interferes with its activation by $\Delta\mu H^+$, *Eur. J. Biochem.*, **248**, 496–506.
 92. Bakels, R., Walraven, H.S., and Krab, K. (1993) On the activation mechanism of the H^+ -ATP synthase and unusual thermodynamic properties in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Eur. J. Biochem.*, **213**, 957–964.
 93. Krab, K., Bakels, R., and Scholts, M. (1993) Activation of the H^+ -ATP synthase in thylakoid vesicles from the cyanobacterium *Synechococcus* 6716 by $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. Including a comparison with chloroplasts, and introducing a new method to calibrate light-induced $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**, 197–205.
 94. Bakels, R., van Wielink, J.E., Krab, K., and van Walraven, H.S. (1996) The effect of sulfite on the ATP hydrolysis and synthesis activities in chloroplasts and cyanobacterial membrane vesicles can be explained by competition with phosphate, *Arch. Biochem. Biophys.*, **332**, 170–174.
 95. Hockel, M., Hulla, F.W., Risi, S., and Dose, K. (1978) Kinetic studies on bacterial plasma membrane ATPase (F_1). Nucleotide-induced long term inactivation of ATP hydrolyzing activity is linked to the formation of multiple 'tight' enzyme nucleotide complexes, *J. Biol. Chem.*, **253**, 4292–4296.
 96. Yoshida, M., and Allison, W.S. (1986) Characterization of the catalytic and noncatalytic ADP binding sites of the F_1 -ATPase from the thermophilic bacterium, PS3, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5714–5721.
 97. Paik, S.R., Jault, J.-M., and Allison, W.S. (1994) Inhibition and inactivation of the F_1 adenosinetriphosphatase from *Bacillus* PS3 by dequalinium and activation of the enzyme by lauryl dimethylamine oxide, *Biochemistry*, **33**, 126–133.
 98. Jault, J.M., Matsui, T., Jault, F.M., Kaibara, C., Muneyuki, E., Yoshida, M., Kagawa, Y., and Allison, W.S. (1995) The $\alpha_3\beta_3\gamma$ complex of the F_1 -ATPase from thermophilic *Bacillus* PS3 containing the α D261N substitution fails to dissociate inhibitory MgADP from a catalytic site when ATP binds to noncatalytic sites, *Biochemistry*, **34**, 16412–16418.
 99. Mitome, N., Ono, S., Suzuki, T., Shimabukuro, K., Muneyuki, E., and Yoshida, M. (2002) The presence of phosphate at a catalytic site suppresses the formation of the MgADP-inhibited form of $F(1)$ -ATPase, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 53–60.
 100. Hirano-Hara, Y., Noji, H., Nishiura, M., Muneyuki, E., Hara, K.Y., Yasuda, R., Kinoshita, K. Jr., and Yoshida, M. (2001) Pause and rotation of $F(1)$ -ATPase during catalysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13649–13654.
 101. Hirano-Hara, Y., Ishizuka, K., Kinoshita, K. Jr., Yoshida, M., and Noji, H. (2005) Activation of pausing F_1 motor by external force, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4288–4293.
 102. Saita, E.-I., Iino, R., Suzuki, T., Feniouk, B.A., Kinoshita, K. Jr., and Yoshida, M. (2010) Activation and stiffness of the inhibited states of F_1 -ATPase probed by single-molecule manipulation, *J. Biol. Chem.*, **285**, 11411–11417.

103. Pacheco-Moises, F., Garcia, J.J., Rodriguez-Zavala, J.S., and Moreno-Sanchez, R. (2000) Sulfite and membrane energization induce two different active states of the *Paracoccus denitrificans* F₀F₁-ATPase, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 993–1000.
104. Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (2004) Energy-dependent transformation of F₀F₁-ATPase in *Paracoccus denitrificans* plasma membranes, *J. Biol. Chem.*, **279**, 12319–12324.
105. Moyle, J., and Mitchell, P. (1975) Active/inactive state transitions of mitochondrial ATPase molecules influenced by Mg²⁺, anions and aurovertin, *FEBS Lett.*, **56**, 55–61.
106. Fitin, A.F., Vasilyeva, E.A., and Vinogradov, A.D. (1979) An inhibitory high affinity binding site for ADP in the oligomycin-sensitive ATPase of beef heart submitochondrial particles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 434–439.
107. Minkov, I.B., Fitin, A.F., Vasilyeva, E.A., and Vinogradov, A.D. (1979) Mg²⁺-induced ADP-dependent inhibition of the ATPase activity of beef heart mitochondrial coupling factor F₁, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1300–1306.
108. Roveri, O.A., Muller, J.L., Wilms, J., and Slater, E.C. (1980) The pre-steady state and steady-state kinetics of the ATPase activity of mitochondrial F₁, *Biochim. Biophys. Acta*, **589**, 241–255.
109. Vasilyeva, E.A., Fitin, A.F., Minkov, I.B., and Vinogradov, A.D. (1980) Kinetics of interaction of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate with adenosine triphosphatase of bovine heart submitochondrial particles, *Biochem. J.*, **188**, 807–815.
110. Vasilyeva, E.A., Minkov, I.B., Fitin, A.F., and Vinogradov, A.D. (1982) Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. ADP-specific inhibition as revealed by the steady-state kinetics, *Biochem. J.*, **202**, 9–14.
111. Martins, O.B., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (1988) Pre-steady-state studies of the adenosine triphosphatase activity of coupled submitochondrial particles. Regulation by ADP, *Biochemistry*, **27**, 7552–7558.
112. Galkin, M.A., and Vinogradov, A.D. (1999) Energy-dependent transformation of the catalytic activities of the mitochondrial F₀F₁-ATP synthase, *FEBS Lett.*, **448**, 123–126.
113. Jault, J.-M., Dou, C., Grodsky, N.B., Matsui, T., Yoshida, M., and Allison, W.S. (1996) The $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex of the F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 with the β T165S substitution does not entrap inhibitory MgADP in a catalytic site during turnover, *J. Biol. Chem.*, **271**, 28818–28824.
114. Omote, H., Maeda, M., and Futai, M. (1992) Effects of mutations of conserved Lys-155 and Thr-156 residues in the phosphate-binding glycine-rich sequence of the F₁-ATPase beta subunit of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **267**, 20571–20576.
115. Hu, D., Strotmann, H., Shavit, N., and Leu, S. (1998) The *C. reinhardtii* CF1 with the mutation betaT168S has high ATPase activity, *FEBS Lett.*, **421**, 65–68.
116. Feniouk, B.A., Wakabayashi, C., Suzuki, T., and Yoshida, M. (2012) A point mutation, betaGln259Leu, relieves MgADP inhibition in *Bacillus* PS3 ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, S13.
117. Al-Shawi, M.K., and Nakamoto, K.R. (1998) Intergenic suppression of the γ M23K uncoupling mutation in F₀F₁ ATP synthase by β Glu-381 substitutions: the role of the β 380DELSEED386 segment in energy coupling, *Biochem. J.*, **330**, 707–712.
118. Feniouk, B.A., Rebecchi, A., Giovannini, D., Anefors, S., Mulikidjanian, A.Y., Junge, W., Turina, P., and Melandri, B.A. (2007) Met23Lys mutation in subunit gamma of F(0)F(1)-ATP synthase from *Rhodobacter capsulatus* impairs the activation of ATP hydrolysis by protonmotive force, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1319–1330.
119. Cross, R.L., and Nalin, C.M. (1982) Adenine nucleotide binding sites on beef heart F₁-ATPase. Evidence for three exchangeable sites that are distinct from three noncatalytic sites, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2874–2881.
120. Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., and Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature*, **370**, 621–628.
121. Milgrom, Y.M., Ehler, L.L., and Boyer, P.D. (1991) The characteristics and effect on catalysis of nucleotide binding to noncatalytic sites of chloroplast F₁-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **266**, 11551–11558.
122. Malyan, A.N. (2013) Noncatalytic nucleotide binding sites: properties and mechanism of involvement in ATP synthase activity regulation, *Biochemistry*, **78**, 1512–1523.
123. Milgrom, Y.M., Ehler, L.L., and Boyer, P.D. (1990) ATP binding at noncatalytic sites of soluble chloroplast F₁-ATPase is required for expression of the enzyme activity, *J. Biol. Chem.*, **265**, 18725–18728.
124. Murataliev, M.B., and Boyer, P.D. (1992) The mechanism of stimulation of MgATPase activity of chloroplast F₁-ATPase by non-catalytic adenine-nucleotide binding. Acceleration of the ATP-dependent release of inhibitory ADP from a catalytic site, *Eur. J. Biochem.*, **209**, 681–687.
125. Jault, J.M., and Allison, W.S. (1993) Slow binding of ATP to noncatalytic nucleotide binding sites which accelerates catalysis is responsible for apparent negative cooperativity exhibited by the bovine mitochondrial F₁-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **268**, 1558–1566.
126. Malyan, A.N. (2003) Interaction of oxyanions with thioredoxin-activated chloroplast coupling factor 1, *Biochim. Biophys. Acta*, **1607**, 161–166.
127. Malyan, A.N. (2013) Activation of MgADP-inactivated chloroplast F₁-ATPase depends on oxyanion binding to noncatalytic sites, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **450**, 123–125.
128. Matsui, T., Muneyuki, E., Honda, M., Allison, W.S., Dou, C., and Yoshida, M. (1997) Catalytic activity of the alpha3-beta3gamma complex of F₁-ATPase without noncatalytic nucleotide binding site, *J. Biol. Chem.*, **272**, 8215–8221.
129. Bald, D., Muneyuki, E., Amano, T., Kruip, J., Hisabori, T., and Yoshida, M. (1999) The noncatalytic site-deficient alpha3beta3gamma subcomplex and F₀F₁-ATP synthase can continuously catalyze ATP hydrolysis when P_i is present, *Eur. J. Biochem.*, **262**, 563–568.
130. Amano, T., Matsui, T., Muneyuki, E., Noji, H., Hara, K., Yoshida, M., and Hisabori, T. (1999) alpha3beta3gamma complex of F₁-ATPase from thermophilic *Bacillus* PS3 can maintain steady-state ATP hydrolysis activity depending on the number of non-catalytic sites, *Biochem. J.*, **343**, 135–138.
131. Ishikawa, T., and 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**, 1–5.
132. Hyndman, D.J., Milgrom, Y.M., Bramhall, E.A., and Cross, R.L. (1994) Nucleotide-binding sites on *Escherichia coli* F₁-ATPase. Specificity of noncatalytic sites and inhibition at catalytic sites by MgADP, *J. Biol. Chem.*, **269**, 28871–28877.
133. Weber, J., Wilke-Mounts, S., Grell, E., and Senior, A.E. (1994) Tryptophan fluorescence provides a direct probe of nucleotide binding in the noncatalytic sites of *Escherichia coli* F₁-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **269**, 11261–11268.
134. Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., van Dien, S.J., and Rabinowitz, J.D. (2009) Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 593–599.

135. Lotscher, H.R., de Jong, C., and Capaldi, R.A. (1984) Interconversion of high and low adenosinetriphosphatase activity forms of *Escherichia coli* F₁ by the detergent lauryldimethylamine oxide, *Biochemistry*, **23**, 4140–4143.
136. Bragg, P.D., and Hou, C. (1986) Effect of disulfide cross-linking between alpha and delta subunits on the properties of the F₁ adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **851**, 385–394.
137. Peskova, Y.B., and Nakamoto, R.K. (2000) Catalytic control and coupling efficiency of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase: influence of the F₀ sector and epsilon subunit on the catalytic transition state, *Biochemistry*, **39**, 11830–11836.
138. Montero-Lomeli, M., and Dreyfus, G. (1987) Activation of Mg-ATP hydrolysis in isolated *Rhodospirillum rubrum* H⁺-ATPase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **257**, 345–351.
139. Glaser, E., Hamasur, B., Norling, B., and Andersson, B. (1987) Activation of F₁-ATPase isolated from potato tuber mitochondria, *FEBS Lett.*, **223**, 304–308.
140. Sherman, P.A., and Wimmer, M.J. (1984) Activation of ATPase of spinach coupling factor 1. Release of tightly bound ADP from the soluble enzyme, *Eur. J. Biochem.*, **139**, 367–371.
141. Du, Z., and Boyer, P.D. (1989) Control of ATP hydrolysis by ADP bound at the catalytic site of chloroplast ATP synthase as related to protonmotive force and magnesium, *Biochemistry*, **28**, 873–879.
142. Junge, W. (1970) The critical electric potential difference for photophosphorylation. Its relation to the chemiosmotic hypothesis and to the triggering requirements of the ATPase system, *Eur. J. Biochem.*, **14**, 582–592.
143. Feniouk, B.A., and Junge, W. (2005) Regulation of the F₀F₁-ATP synthase: the conformation of subunit ϵ might be determined by directionality of subunit γ rotation, *FEBS Lett.*, **579**, 5114–5118.
144. Bakker-Grunwald, T., and van Dam, K. (1974) On the mechanism of activation of the ATPase in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **347**, 290–298.
145. Rosing, J., Kayalar, C., and Boyer, P.D. (1977) Evidence for energy-dependent change in phosphate binding for mitochondrial oxidative phosphorylation based on measurements of medium and intermediate phosphate-water exchanges, *J. Biol. Chem.*, **252**, 2478–2485.
146. Kayalar, C., Rosing, J., and Boyer, P.D. (1976) 2,4-Dinitrophenol causes a marked increase in the apparent K_m of P_i and of ADP for oxidative phosphorylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 1153–1159.
147. McCarthy, J., and Ferguson, S.J. (1983) Characterization of membrane vesicles from *Paracoccus denitrificans* and measurements of the effect of partial uncoupling on their thermodynamics of oxidative phosphorylation, *Eur. J. Biochem.*, **132**, 417–424.
148. Al-Shawi, M.K., Parsonage, D., and Senior, A.E. (1990) Thermodynamic analyses of the catalytic pathway of F₁-ATPase from *Escherichia coli*. Implications regarding the nature of energy coupling by F₁-ATPases, *J. Biol. Chem.*, **265**, 4402–4410.
149. Feniouk, B.A., Suzuki, T., and Yoshida, M. (2007) Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit ϵ in bacterial ATP synthase, *J. Biol. Chem.*, **282**, 764–772.
150. Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (2006) Energy-linked binding of P_i is required for continuous steady-state proton-translocating ATP hydrolysis catalyzed by F₀F₁ ATP synthase, *Biochemistry*, **45**, 14552–14558.
151. Senior, A.E., Lee, R.S., Al-Shawi, M.K., and Weber, J. (1992) Catalytic properties of *Escherichia coli* F₁-ATPase depleted of endogenous nucleotides, *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 340–344.
152. Dunn, S.D., Zadorozny, V.D., Tozer, R.G., and Orr, L.E. (1987) Epsilon subunit of *Escherichia coli* F₁-ATPase: effects on affinity for aurovertin and inhibition of product release in unisite ATP hydrolysis, *Biochemistry*, **26**, 4488–4493.
153. Kato, Y., Sasayama, T., Muneyuki, E., and Yoshida, M. (1995) Analysis of time-dependent change of *Escherichia coli* F₁-ATPase activity and its relationship with apparent negative cooperativity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1231**, 275–281.
154. Fischer, S., Graber, P., and Turina, P. (2000) The activity of the ATP synthase from *Escherichia coli* is regulated by the transmembrane proton motive force, *J. Biol. Chem.*, **275**, 30157–30162.
155. Sekiya, M., Hosokawa, H., Nakanishi-Matsui, M., Al-Shawi, M.K., Nakamoto, R.K., and Futai, M. (2010) Single molecule behavior of inhibited and active states of *Escherichia coli* ATP synthase F₁ rotation, *J. Biol. Chem.*, **285**, 42058–42067.
156. D'Alessandro, M., Turina, P., and Melandri, B.A. (2008) Intrinsic uncoupling in the ATP synthase of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1518–1527.
157. Konno, H., Murakami-Fuse, T., Fuji, F., Koyama, F., Ueoka-Nakanishi, H., Pack, C.-G., Kinjo, M., and Hisabori, T. (2006) The regulator of the F₁ motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F₁-ATPase by the epsilon subunit, *EMBO J.*, **25**, 4596–4604.
158. Tsumuraya, M., Furuie, S., Adachi, K., Kinoshita Jr., K., and Yoshida, M. (2009) Effect of epsilon subunit on the rotation of thermophilic *Bacillus* F₁-ATPase, *FEBS Lett.*, **583**, 1121–1126.
159. Sugawa, M., Okazaki, K.-I., Kobayashi, M., Matsui, T., Hummer, G., Masaike, T., and Nishizaka, T. (2016) F₁-ATPase conformational cycle from simultaneous single-molecule FRET and rotation measurements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 2916–2924.
160. Hara, K.Y., Kato-Yamada, Y., Kikuchi, Y., Hisabori, T., and Yoshida, M. (2001) The role of the betaDELSEED motif of F₁-ATPase: propagation of the inhibitory effect of the epsilon subunit, *J. Biol. Chem.*, **276**, 23969–23973.
161. Ferguson, S.A., Cook, G.M., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., and Walker, J.E. (2016) Regulation of the thermoalkaliphilic F₁-ATPase from *Caldalkalibacillus thermarum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 10860–10865.
162. Haruyama, T., Hirono-Hara, Y., and Kato-Yamada, Y. (2010) Inhibition of thermophilic F₁-ATPase by the ϵ subunit takes different path from the ADP-Mg inhibition, *Biophysics*, **6**, 59–65.
163. Mizumoto, J., Kikuchi, Y., Nakanishi, Y.-H., Mouri, N., Cai, A., Ohta, T., Haruyama, T., and Kato-Yamada, Y. (2013) ϵ subunit of *Bacillus subtilis* F₁-ATPase relieves MgADP inhibition, *PLoS One*, **8**, e73888.
164. Kato-Yamada, Y., Bald, D., Koike, M., Motohashi, K., Hisabori, T., and Yoshida, M. (1999) Epsilon subunit, an endogenous inhibitor of bacterial F₁-ATPase, also inhibits F₀F₁-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **274**, 33991–33994.
165. Iino, R., Murakami, T., Iizuka, S., Kato-Yamada, Y., Suzuki, T., and Yoshida, M. (2005) Real-time monitoring of conformational dynamics of the epsilon subunit in F₁-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **280**, 40130–40134.
166. Cingolani, G., and Duncan, T.M. (2011) Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 701–707.
167. Shirakihara, Y., Leslie, A.G., Abrahams, J.P., Walker, J.E., Ueda, T., Sekimoto, Y., Kambara, M., Saika, K., Kagawa, Y., and Yoshida, M. (1997) The crystal structure of the nucleotide-free alpha3beta3 subcomplex of F₁-ATPase from the thermophilic *Bacillus* PS3 is a symmetric trimer, *Structure*, **5**, 825–836.

168. Menz, R.I., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2001) The structure and nucleotide occupancy of bovine mitochondrial F(1)-ATPase are not influenced by crystallisation at high concentrations of nucleotide, *FEBS Lett.*, **494**, 11–14.
169. Lodeyro, A.F., Castelli, M.V., and Roveri, O.A. (2008) ATP hydrolysis-driven H⁺ translocation is stimulated by sulfate, a strong inhibitor of mitochondrial ATP synthesis, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**, 269–279.
170. Shah, N.B., Hutcheon, M.L., Haarer, B.K., and Duncan, T.M. (2013) F₁-ATPase of *Escherichia coli*: the ε-inhibited state forms after ATP hydrolysis, is distinct from the ADP-inhibited state, and responds dynamically to catalytic site ligands, *J. Biol. Chem.*, **288**, 9383–9395.

ADP-INHIBITION OF H⁺-F₀F₁-ATP SYNTHASE

A. S. Lapashina^{1,2} and B. A. Feniouk^{1,2*}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia;
E-mail: feniouk@fbb.msu.ru

² Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119991 Moscow, Russia

Received December 6, 2017

Revision received June 8, 2018

H⁺-F₀F₁-ATP synthase (F-ATPase, F-type ATPase, F₀F₁-complex) catalyzes ATP synthesis from ADP and inorganic phosphate in eubacteria, mitochondria, chloroplasts and some archaea. ATP synthesis is powered by transmembrane proton transport driven by the proton-motive force (*pmf*) generated by the respiratory or photosynthetic electron transport chain. Upon the reduction or disappearance of the *pmf* ATP synthase can catalyze the reverse reaction, working as an ATP-dependent proton pump. ATPase activity of the enzyme is regulated by several mechanisms, of which the most conservative is the non-competitive inhibition by MgADP complex (ADP-inhibition). If ADP without phosphate is bound in a catalytic site, the enzyme may undergo a conformational change that locks the bound ADP and completely inactivates the enzyme. *Pmf* can induce the release of the inhibitory ADP and re-activate the enzyme. In some organisms it seems that the *pmf* necessary for activation exceeds the level necessary for ATP synthesis. Moreover, *pmf* also increases the affinity of the catalytic site to phosphate, reduces the probability of ADP binding without phosphate and thereby prevents the transition of ATP synthase into the ADP-inhibited state. Besides phosphate, some compounds including other oxyanions (e.g. sulfite), alcohols, lauryldimethylamine oxide (LDAO) and a few other detergents can also weaken ADP-inhibition and increase the ATPase activity of the enzyme. In this paper, we review the ADP-inhibition characteristics of ATP synthases from different organisms, discuss the role of this phenomenon *in vivo* and its relationship with other regulatory mechanisms – ATPase activity inhibition by subunit epsilon and nucleotide binding in the non-catalytic sites of the enzyme. We also note that in *Escherichia coli* enzyme ADP-inhibition pattern is different: it is weak and is not relieved but seems to be enhanced by phosphate.

Keywords: ATP synthase, F-ATPase, ADP-inhibition, regulation, LDAO, sulfite, bioenergetics, F₀F₁