

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Кошенко Татьяна Анатольевна

**Генетическая и биохимическая характеристика
F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609**

03.02.07 – генетика.

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:
кандидат биологических наук
М.Г.Алексеева**

Москва
2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. Литературный обзор.....	12
1.1 F₀F₁- АТФ-синтазный комплекс белков.....	12
1.1.1 Классификация и эволюция АТФ-синтаз.....	12
1.1.2 Структура и механизм действия F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы.....	18
1.1.3 F ₀ F ₁ -АТФ-синтазный оперон бактерий.....	24
1.1.4 Консервативность и вариабельность субъединиц F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы бактерий.....	26
1.1.5 Функции F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы	29
1.1.6 Особенности F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы <i>Streptomyces</i>	31
1.2 Фосфорилирование АТФ-синтазы.....	32
1.2.1 Механизмы и функции фосфорилирования белков.....	34
1.2.2 Фосфорилирование белков у эукариот и прокариот.....	35
1.2.3 Фосфорилирования субъединиц F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы.....	36
1.3 F₀F₁-АТФ-синтазы бактерий – как биомишень действия олигомицина.....	39
1.3.1 Химические модификации олигомицина А.....	40
1.3.2 Грамположительные бактерии, чувствительные к олигомицину А.....	44
1.3.3 Механизм действия олигомицина А на F ₀ F ₁ -АТФ-синтазу бактерий	45
Глава 2. Материалы и методы.....	48
2.1 Штаммы бактерий.....	48
2.2. Векторы, использованные для клонирования фрагментов ДНК.....	48
2.3. Культивирование бактерий.....	49
2.4. Выделение геномной ДНК штамма <i>S. fradiae</i> ATCC 19609.....	51
2.5. Амплификация ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	51
2.6. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля.....	53
2.7. Выделение плазмидной ДНК из <i>E. coli</i> методом щелочного лизиса.....	54
2.8. Выделение плазмидной ДНК с использованием набора “Plasmid Miniprep Kit”.....	54
2.9. Клонирование субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы.....	55
2.9.1 Рестрикция.....	55
2.9.2 Лигирование.....	55
2.10. Трансформация.....	56
2.10.1 Получение компетентных клеток <i>E. coli</i> для химической трансформации.....	56

2.10.2 Трансформация клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК или лигазной смесью.....	57
2.11. Определение нуклеотидной последовательности отобранных клонов (сиквенс)...	57
2.12. Анализ экспрессии генов F₀F₁-АТФ-синтазы в системе <i>E. coli</i>/BL21(DE3).....	57
2.13. Двумерный гель-электрофорез (SDS-PAGE).....	59
2.13.1 Состав растворов для проведения двумерного электрофореза белков.....	60
2.13.2 Приготовление посуды.....	60
2.13.3 Электрофорез белков в первом направлении.....	60
2.13.4 Электрофорез белков во втором направлении.....	60
2.14. Выделение и очистка белков методом металлоаффинной хроматографии с помощью набора Ni-NTA Fast Start Kit (6) («Qiagen»).....	61
2.15. Количественный анализ белков методом Бредфорд.....	61
2.16. Получение суммарного препарата СТПК <i>S. fradiae</i> ATCC 19609.....	63
2.16.1 Получение экстрактов.....	63
2.16.2.Выделение протеинкиназ.....	63
2.17 Фосфорилирование субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы.....	63
2.18 Получение препаратов мембранных везикул для протеомного анализа.....	64
2.19 Фосфорилирование белков мембранных везикул.....	65
2.20 Подготовка образцов для масс-спектрометрии.....	65
2.21 Получение препаратов инвертированных мембранных везикул <i>S. fradiae</i> для измерения АТФ-синтазной активности.....	65
2.22 Измерение АТФ-синтазной активности в препаратах инвертированных мембранных везикул <i>S. fradiae</i> ATCC 19609.....	66
2.23. Биоинформатические методы анализа.....	67
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	68
3.1 Биоинформатический анализ F₀F₁-АТФ-синтазы <i>Streptomyces fradiae</i> ATCC 19609.....	68
3.2 Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы штамма <i>S. fradiae</i> ATCC 19609 с ортологами из белковой базы данных.....	74
3.3 Получение рекомбинантных белков субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы <i>S. fradiae</i> ATCC 19609.....	76
3.4 Фосфорилирование рекомбинантных субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы <i>S. fradiae</i> ATCC 19609 суммарным препаратом СТПК <i>in vitro</i>.....	79
3.5 Идентификация фосфорилированных белков во фракции мембранных везикул <i>S. fradiae</i> ATCC 19609.....	82

3.6 Определение ингибирующего действия олигомицина А и его производных на активность F_0F_1 -АТФ-синтазы <i>Streptomyces fradiae</i> ATCC 19609.....	88
Заключение.....	95
Выводы.....	96
Список сокращений.....	97
Благодарности.....	98
Список литературы.....	99
Приложения.....	120

Введение

Актуальность темы исследования

Важнейшие метаболические процессы в про- и эукариотических клетках требуют энергии (сигнала) распада АТФ. Энергозависимо практически любое биологическое событие, снижение уровня АТФ в клетке приводит к нарушению ее функционирования или гибели. Ключевым ферментом клеточного энергетического обмена является F_0F_1 -АТФ-синтаза (ЕС 3.6.1.34), этот комплекс присутствует на внутренней мембране митохондрий, мембране тилакоидов хлоропластов, цитоплазматической мембране растений (Алексеева М.Г. и др., 2009). АТФ-синтаза прямо или косвенно связана с различными заболеваниями человека. Снижение регуляции митохондриальной АТФ-синтазы является отличительной чертой большинства человеческих карцином, которые являются воплощением биоэнергетической сигнатуры рака при выполнении пониженного окислительного фосфорилирования и повышенного аэробного гликолиза. В сочетании с биоэнергетической сигнатурой рака исследования показали, что митохондриальная АТФ-синтаза и множественная лекарственная устойчивость и неблагоприятный прогноз опухоли тесно связаны (Moser T.L. et al., 2001; Moser T.L. et al., 1999; Moser T.L. et al., 2002).

Дисфункция АТФ-синтазы вследствие мутаций субъединицы а встречается при нейропатии, атаксии и некрозе (De Meirleir L. et al., 1995; Thyagarajan D. et al., 1995). Дефицит АТФ-синтазы наблюдается в митохондриях при болезни Паркинсона, Альцгеймера (Schägger H. et al., 1995). АТФ-синтазы на поверхности эндотелиальных клеток, играют важную роль в процессе ангиогенеза, происходящего при росте опухоли (Moser T.L. et al., 2001; Moser T.L. et al., 1999; Moser T.L. et al., 2002; Wahl M.L. et al., 2005). В связи с этим, в последние годы F_0F_1 -АТФ-синтаза и сопряженный с ней комплекс белков бактерий и митохондрий человека становятся все более пристальным объектом внимания как биомишень для создания лекарств (Thyagarajan D et al., 1995; Senior A.E. et al., 2007; Kato-Yamada Y. et al., 1998), а также ключевым объектом исследований

фундаментальных основ биоэнергетики живых систем, поскольку нормальное функционирование данного комплекса практически важно для здоровья и продолжительности жизни человека.

F_0F_1 -АТФ-синтаза является ферментом, наделенным бифункциональным каталитическим механизмом синтеза и гидролиза АТФ, который функционирует как вращающийся двигатель. F_0F_1 -АТФ-синтаза представляет собой многосубъединичный фермент, состоящий из растворимой F_1 -части, катализирующей синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата и связанной с ней F_0 -части, погруженной в мембрану клетки. F_1 -часть F_0F_1 -АТФ-синтазы бактерий включает пять субъединиц: α , β , γ , δ и ϵ . F_0 -часть синтазы содержит три субъединицы: a , b и c (Borghese R. et al., 1998). Структура большинства субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы является весьма консервативной для всех организмов. Универсальная природа F_0F_1 -АТФ-синтазы у всех живых организмов, включая бактерий и человека, ее роль биологического наномотора требует детальных исследований функционирования этого комплекса у всех организмов.

АТФазы структурно хорошо охарактеризованы, но существование и функциональное значение многих посттрансляционных модификаций (ПТМ) недостаточно изучены. Функционирование F_0F_1 - АТФ-синтазы регулируется сигналом передающей системой, одним из элементов которой являются серин-треониновые протеинкиназы (Алексеева М.Г. и др., 2009). Поэтому важной задачей является изучение фосфорилирования белков F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса. Фосфорилирование и дефосфорилирование белков - один из наиболее распространенных механизмов регулирования физиологических процессов в эукариотических клетках. Эта модификация влияет на многие свойства белков, в частности на их конформацию, сайты связывания, ферментативную активность, специфичность и т. д. Фосфорилирование и дефосфорилирование субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы можно рассматривать как один из возможных механизмов, которые регулируют активность синтеза АТФ.

В литературе имеются единичные указания на фосфорилирование δ - и c -субъединиц в митохондриях эукариот (Zhang F. X. et al., 1995; Wittig I. et al., 2008). Фосфорилирование β -субъединицы было выявлено в условиях теплового стресса в хлоропластах риса (Chen X, et al., 2011), в изолированных миоцитах кролика при лечении аденозином, который индуцирует кардиозащиту (Covian R. et al., 2012). Было показано, что каталитическая β -субъединица АТФ-синтазы фосфорилируется в митохондриях скелетной мышцы человека, это коррелирует с уровнем глюкозы и может способствовать патогенезу диабета типа 2 (Højlund K. et al., 2003).

Поэтому актуальной задачей является изучение фосфорилирования белков F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса изучение способности белков F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса к фосфорилированию у бактерий, что позволит выявить новые аспекты функционирования F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса на стадии сборки, а также на стадии синтеза или гидролиза АТФ.

Восприимчивость к фосфорилированию может касаться дизайна ингибиторов ферментов, которые нацелены на c -субъединицы. Ингибирование F_0F_1 -АТФ-синтазы патогенных бактерий может быть использовано для конструирования тест-систем и создания новых биомишень-направленных лекарств.

F_0F_1 -АТФ-синтазы актинобактерий при большом структурном сходстве отличает от других бактерий зависимость активности фермента от ионов Ca^{2+} (Hensel M. et al., 1991; Hensel M., Ahmus H. et al., 1991) и чувствительность к антибиотику олигомицину А (Hensel M., Ahmus H. et al., 1991). Основной биомишенью действия является c -субъединица F_0F_1 -АТФ-синтазы и ее гомолог у эукариотических клеток. Известно, что F_0F_1 -АТФ-синтазы митохондрий человека, дрожжей, грибов более чувствительны к ингибиторам синтеза АТФ, например, олигомицинам, а более устойчивыми являются бактерии, за исключением некоторых грамположительных бактерий. Этот феномен позволяет рассматривать олигомицин А и его производные, как потенциальные ингибиторы

АТФ-зависимых процессов, в том числе и лекарственной устойчивости клинических штаммов грамположительных бактерий.

Степень разработанности темы исследования

Известно, что штаммы *Streptomyces*, различаются по уровню чувствительности к олигомицину А. Штамм *S. avermitilis* МА-4680 (продуцент олигомицина) устойчив к олигомицину А в концентрации >100 нмоль/мл или 1000 нмоль/диск, штамм *S. lividans* ТК24 является олигомицин-чувствительной моделью и устойчив в концентрации >0,1 нмоль/мл или 0.5 нмоль/диск, штамм *Streptomyces fradiae* АТСС 19609 (продуцент тилозина) гиперчувствительный к олигомицину А (<0.001 нмоль/мл или 0.0005 нмоль/диск).

Было показано, что во фракции мембранных везикул актинобактерии *S. fradiae* АТСС 19609 содержатся, по крайней мере, две активные серин-треониновые протеинкиназы (СТПК), способные фосфорилировать мембранные белки, что указывает на возможность фосфорилирования белков субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609 (Elizarov S.M. et al., 2000; Elizarov S.M. et al., 2001).

Антибиотики семейства олигомицинов являются классическими ингибиторами F₀F₁-АТФ-синтазы человека и бактерий, и рассматриваются как потенциальные лекарственные препараты, однако их продвижение в качестве фармацевтических препаратов ограничивается высокой токсичностью. Впервые российскими учеными получены более 20 полусинтетических производных олигомицина А, обладающих более низкой токсичностью (Lysenkova L.N. et al., 2013; Lysenkova L.N. et al., 2014).

Цели исследования:

Изучение кластера генов, кодирующего субъединицы F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609; анализ активности и функционирования данного комплекса.

Задачи исследования:

1. Характеристика субъединиц F_0F_1 АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609, сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц с ортологами из белковой базы данных;
2. Получение рекомбинантных белков субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы, изучение способности их к фосфорилированию суммарным препаратом СТПК *S. fradiae* АТСС 19609;
3. Протеомный анализ фосфорилированных белков субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы во фракции мембранных везикул *S. fradiae* АТСС 19609;
4. Определение ингибирующего действия олигомицина А и его производных на активность F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* АТСС 19609

Научная новизна

В данной диссертационной работе определены нуклеотидные последовательности генов всех 8 субъединиц и расположение данных генов в кластере F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609, осуществлено клонирование генов субъединиц в *E. coli* и получены рекомбинантные белки.

Впервые показано, что рекомбинантные белки γ -, β - α - и ε - субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* АТСС 19609 фосфорилируются комплексом СТПК в составе клеточного экстракта. Впервые установлено, что во фракции мембранных везикул осуществляется фосфорилирование β - и ν -субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса. В обоих типах экспериментов наблюдается фосфорилирование β -субъединицы.

Впервые тестированно 6 новых производных олигомицина А, модифицированных как по макролактонному кольцу, так и по С33 положению и выявлены производные, ингибирующее действие которых превышает действие олигомицина А.

Теоретическая и практическая значимость работы

Объектом исследования диссертационной работы являлась F_0F_1 -АТФ-синтаза штамма *S. fradiae* ATCC 19609, гиперчувствительного к ингибитору олигомицину А.

Штаммы *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиды с клонированными генами субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы, разработанные методы выделения белков и выделенные рекомбинантные белки могут быть использованы в научно-исследовательских работах с последующим потенциальным применением в области практической медицины.

Метод изучения ингибирующего влияния олигомицина А и его производных на синтез АТФ F_0F_1 -АТФ-синтазой инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* может быть использован для предварительного отбора соединений – потенциальных лекарственных препаратов.

Апробация работы

Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2009-2012 г. Стендовые доклады были представлены на итоговых конференциях за 2009-2010 г. в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». Промежуточные результаты диссертационной работы были представлены на лабораторном семинаре 06 марта 2018 г.

Апробация диссертационной работы проведена 13 марта 2018 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

Положения, выносимые на защиту

1. Структура кластера и генетическое окружение F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса консервативны для актинобактерий рода *Streptomyces*.

2. Белки субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 фосфорилируются серин-треониновыми протеинкиназами.
3. Структурные модификации олигомицина А по макролактонному кольцу и по С33-положению в различной степени влияют на ингибирование синтеза АТФ в везикулах *S. fradiae* по сравнению с уровнем ингибирования олигомицина А.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК:

1. Беккер О.Б., Мавлетова Д.А., Любимова И.К., **Мирончева Т.А.**, Штиль А.А., Даниленко В.Н. Индукция программированного лизиса культуры *Streptomyces lividans* ингибиторами серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа. Микробиология. 2012. Т.81. №2: 177-184.
2. Алексеева М.Г., **Мирончева Т.А.**, Мавлетова Д.А., Елизаров С.М., Захаревич Н.В., Даниленко В.Н. Биохимическая и структурная характеристика F_0F_1 -АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609/ Биохимия. 2015. № 3: 358-373

Публикации в тезисах научных конференций:

Nezametdinova V.Z., Alekseeva M.G., **Mironcheva T.A.**, Danilenko V.N. Structural and Functional Characterization of Eukaryotic Type Serin-Treonin Protein Kinases in the *Bifidobacterium longum* B379M Strain. Abstracts 2nd International Congress-Partnering & Exhibition on Biotechnology and Bioenergy. World Trade Center, Moscow, Russia., 2010. 326.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 F₀F₁- АТФ-синтазный комплекс белков

F₀F₁-АТФ-синтаза является ферментом окислительного фосфорилирования (комплекс V системы ОХРНОС), катализирующим синтез аденозин трифосфата (АТФ) из аденозин дифосфат (АДФ) и неорганического фосфата (P_i) с использованием энергии электрохимического потенциала. Этот фермент также функционирует и в обратном направлении, когда электрохимического потенциала становится недостаточно, фермент катализирует протонный насос, формируя электрохимический потенциал за счет гидролиза АТФ. F₀F₁-АТФ-синтаза - это исключительно сложный белковый комплекс, имеющий молекулярную массу более 500 кДа и состоящий из двух частей - F₀ и F₁ (Okuno D. et al., 2011).

Систематическое название фермента, согласно номенклатуре ферментов IUBMB (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology - Международный союз биохимии и молекулярной биологии) , "АТР phosphohydrolase (H⁺-transporting)". Другие употребляемые названия: F₁-АТФазы; F₀F₁-АТФазы, H⁺-АТФазы; бактериальные Ca²⁺ / Mg²⁺ АТФазы, но наиболее широкое распространение, в настоящее время, получило название " F₀F₁-АТФ-синтаза", отражающее основную функцию фермента (Enzyme Nomenclature: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Обозначение F-тип происходит от "phosphorylation Factor" (фактор фосфорилирования), компонент F₁ является сокращением от «Fraction 1» (часть 1), а компонент F₀ обозначает участок связывания олигомицина.

1.1.1 Классификация и эволюция АТФ-синтаз

Бактерии и археи являются наиболее примитивными формами жизни на Земле. Тем не менее, они характеризуются удивительным разнообразием метаболизма, особенно в процессах получения энергии и синтеза АТФ. Это позволяет им выживать в различных местах обитания, зачастую экстремальных. В центре всех биоэнергетических процессов находятся общие для большинства

видов бактерий, независимо от способа использования энергии из окружающей среды, АТФазы.

Среди мембранных АТФаз выделяют два типа: F-тип (встречаются у бактерий и в органеллах эукариот) (Boyer P.D. et al., 1997; Stock D. et al., 1999; Capaldi R.A. et al., 2002; Kabaleswaran V. et al., 2006) и A/V-тип (встречаются у архей и в вакуолях эукариот) (Müller V. et al., 2003; Coskun U. et al., 2004; Drory O. et al., 2006; Lapierre P. et al., 2006; Nakanishi-Matsui M. et al., 2006).

Вместе с двумя эволюционно разными семействами, АТФазами Р-типа и АВС транспортерами, F/V АТФазы принадлежат к гетерогенной группе ферментов, которые используют энергию гидролиза АТФ для ионного трансмембранного транспорта (Saier M.H. Jr. et al., 2000). Тем не менее, F/V АТФазы функционально уникальны, поскольку они могут эффективно работать в режиме АТФ-синтазы, и механически, так как их реакционный цикл сопровождается вращением одной части фермента (ротора) по отношению к другой (статора) (Capaldi R.A. et al., 2002; Noji H. et al., 1997; Pänke O. et al., 2000).

Все F/V-АТФазы имеют грибоподобную структуру, с головкой, выступающей $\sim 100 \text{ \AA}$ над мембраной (Müller V. et al., 2003; Drory O. et al., 2006; Nakanishi-Matsui M. et al., 2006; Forgacs M. et al., 2007; Stock D. et al., 2000) (рисунок 1).

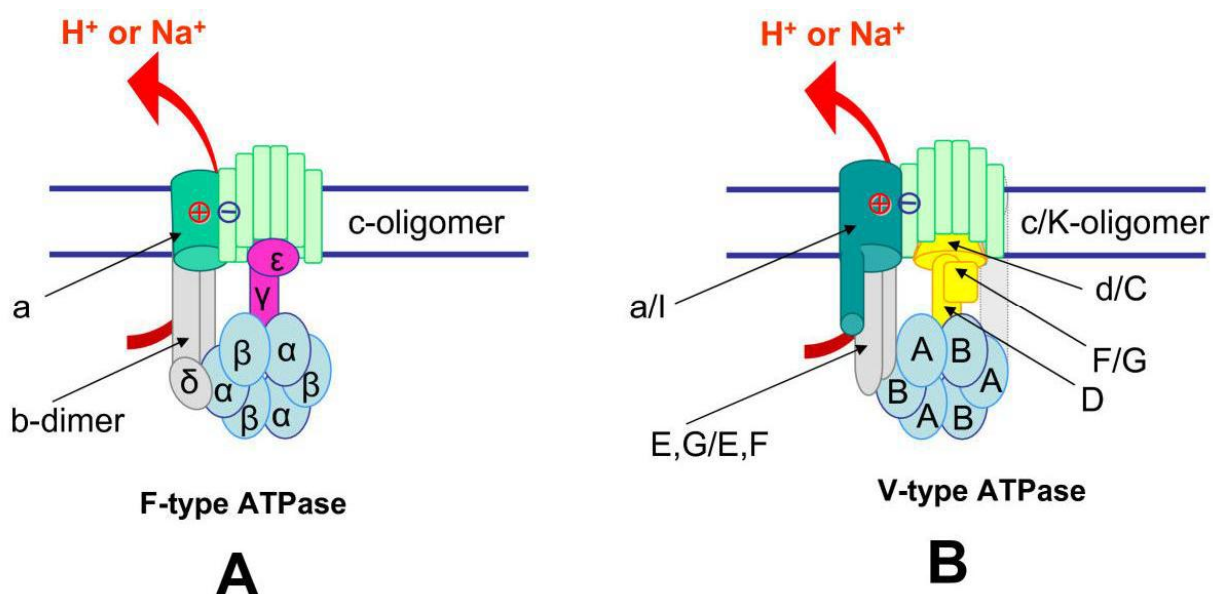


Рисунок 1: Структура и эволюционные соотношения АТФаз F- (А) и V- типа (В). Субъединицы ортологи представлены одним цветом и формой; не связанные, но функционально аналогичные субъединицы центральной ножки представлены разными цветами и формой; структурно аналогичные, но не гомологичные субъединицы выделены разными, но схожими цветами (Mulkidjanian A.Y. et al., 2008).

АТФазы V-типа, имеют общий каркас с F-АТФазами, но и много структурных и функциональных особенностей (Drory O. et al., 2006; Forgacs M. et al., 2007; Perzov N. et al., 2001; Beyenbach K.W. et al., 2006) (рис. 1). В частности, помимо большой α -субъединицы и с-олигомера, V_o сектор содержит δ -субъединицу, которая служит гнездом для d- и f-субъединиц центральной оси V_1 (Iwata M. et al., 2004; Thaker Y.R. et al., 2007).

АТФазы F/V-типа широко распространены у трех представителей клеточной формы жизни (бактерии, археи и эукариоты) и играют важную роль в клеточном метаболизме вследствие их уникальной способности использовать ионный градиент для производства АТФ. Помимо того, что F/V-АТФазы являются биологическими наномоторами (Itoh H. et al., 2004), эти ферменты, в зависимости от их ионной специфичности, определяют характер биоэнергетического цикла в любом организме. Биоэнергетические циклы митохондрий, хлоропластов, большинства прокариот включают генерацию

протон-движущей силы (PMF) первичной транспортной системы (H^+ - насос), и используют ее для синтеза АТФ, а также для транспорта растворенных веществ, подвижности, обратного транспорта электронов, и т.д. (Cramer W.A. et al., 1990). Однако, некоторые экстремофилы (в частности, теплолюбивые и алкалофильные) анаэробные бактерии и археи используют Na^+ -ионы вместо или в дополнение к H^+ (Skulachev V. P. et al., 1988; Dimroth P. et al., 1997; Hase C.C. et al., 2001). Аналогично H^+ -циклу, Na^+ -цикл включает основной Na^+ - насос, Na^+ -мембранный транспорт АТФ-синтазы, Na^+ -зависимые мембранные транспортеры или Na^+ -зависимые двигательные жгутики.

Благодаря почти повсеместному присутствию в клетках, PMF обычно рассматривается как основной промежуточный продукт при трансдукции биологической энергии, с точки зрения эволюционной истории и текущего значения, для фотосинтеза и дыхания (Deamer D.W. et al., 1997). В отличие от этого, способность некоторых прокариот использовать градиент натрия для синтеза АТФ, как правило, рассматривают как позднюю адаптацию к выживанию в экстремальных условиях (Dimroth P. et al., 1997; Konings W.N. et al., 2006; Konings W.N. et al., 2002; von Ballmoos C. et al., 2007). Структурный и филогенетический анализ показывают, что АТФазы с Na^+ - транспортом, скорее всего, в процессе эволюции появились ранее АТФаз с H^+ -транспортом, а первоначальная мембранная энергетика работала с помощью Na^+ -градиента.

Сравнения последовательностей и структуры F- и V-типа АТФаз показали гомологию между их каталитическими и мембранными субъединицами (α и b ; β и a ; встроенными в мембрану C/K-олигомеров), но не между субъединицами γ и ϵ , расположенными на центральной оси (рис.1), которая соединяет каталитические и мембранные компоненты (Lapierre P. et al., 2005; Gogarten J.P. et al., 1989; Pallen M.J. et al., 2006; Mulkidjanian A.Y. et al., 2007). На основании этой модели гомологии, предполагается, что эти АТФазы происходят от мембранных белков-транслоказ, произошедших от РНК-транслоказ, содержащих полимер центральной ножки, перемещающийся на месте (Mulkidjanian A.Y. et al., 2007).

Этот анализ добавил некоторую определенность в классификацию вращающихся АТФаз. Большинство авторов классифицируют АТФазы V-типа на эукариотические и бактериальные (Drory O. et al., 2006; Nakanishi-Matsui M. et al., 2006; Murata T. et al., 2005), другие считают, что прокариотические V-АТФазы должны быть выделены в отдельную группу - A-тип АТФаз (от архей), предложенную Gogarten и Starke (Gogarten J.P. et al., 2007). Также на отдельные группы (V- и F- тип) классифицируют эукариотические АТФазы (Müller V. et al., 2003; Müller V. et al., 2005; Müller V., Lingl A. et al., 2005). Последнее деление в значительной степени игнорирует тот факт, что гены АТФазы V-типа присутствуют во многих недавно секвенированных бактериальных геномах, и последовательности бактериальных субъединиц V-АТФаз тесно связаны с эукариотами и археями. Действительно, V-АТФазы являются единственным типом мембранных АТФаз у всех бактерий типа *Deinococcus-Thermus* (Lapierre P. et al., 2005), *Chlamydia and Spirochaetes* (Mulkidjanian A.Y. et al., 2008). Опероны F-АТФаз хламидии *Protochlamydia amoebophila* и спирохеты *Leptospira spp*, а также универсальный V –АТФазы архей и других бактерий, убедительно показывают, что бактерии приобрели V-тип АТФазы от архей, через несколько стадий горизонтальных переносов (Hilario E. et al., 1998). Кроме того, наличие генов F-АТФазы в геномах архей *Methanosarcina acetivorans* и *Methanosarcina barkeri* (Sumi M. et al., 1997), за исключением *Methanosarcina mazei*, вероятно, отражает приобретение соответствующих генов бактериями. Кроме того, отсутствие гомологии между субъединицами центральной оси указывает на большую дихотомию между АТФазами F- и V-типа. В отличие от этого, все субъединицы прокариотических АТФаз A/V-типа имеют своих аналогов в вакуолярных V-АТФазах эукариот. Эукариотические V-АТФазы являются более сложными, чем АТФазы архей и бактерий, благодаря наличию нескольких дополнительных субъединиц (Drory O. et al., 2006; Nakanishi-Matsui M. et al., 2006). Подобный феномен наблюдается также в F-АТФазах, где митохондриальный фермент имеет несколько дополнительных субъединиц по сравнению с бактериальным (Senior A.E. 2007; Stock D. et al., 1999). Анализ

последовательностей также указывает на то, что основное эволюционное различие лежит между АТФазами F- и V- типа, с последующим вторичным расхождением между прокариотическими и эукариотическими ферментами. В каждой из ветвей филогенетических деревьев, построенных для субъединиц бактериальных, архейных и эукариотических V-АТФаз, кластер находится вместе, либо отдельно от АТФаз F-типа (Gogarten J.P. et al., 1989; Hilario E. et al., 1993; Hilario E. et al., 1998).

Учитывая все вышеперечисленные особенности эволюции АТФаз, можно сделать вывод, что бактерии и археи произошли от общего предка, имеющего примитивные мембраны, которые пропускали ионы и протоны металлов, но задерживали РНК и белки, что привело к возникновению систем секреции. Появление мембран у бактерий и архей – независимый процесс, произошедший после разделения их линий.

В связи с освоением новых мест обитания, с высокой концентрацией Na^+ , образовывались натриевые насосы, что привело к преобразованию системы секреции в Na -движущую АТФ-синтазу. Создаваемый химическими насосами натриевый градиент частично расходовался на синтез АТФ.

При освоении сильноокислых местообитаний, Na^+ -АТФ-синтаза мутировала в протонную, использующую энергию АТФ для транспорта H^+ , а у некоторых прокариот эту функцию выполняли комплексы дыхательной цепи. Схему эволюции мембранной биоэнергетики подробно отражает постепенное вытеснение натриевой энергетики и переход к протонной (рисунок 2) (Никитин М.А. 2013).

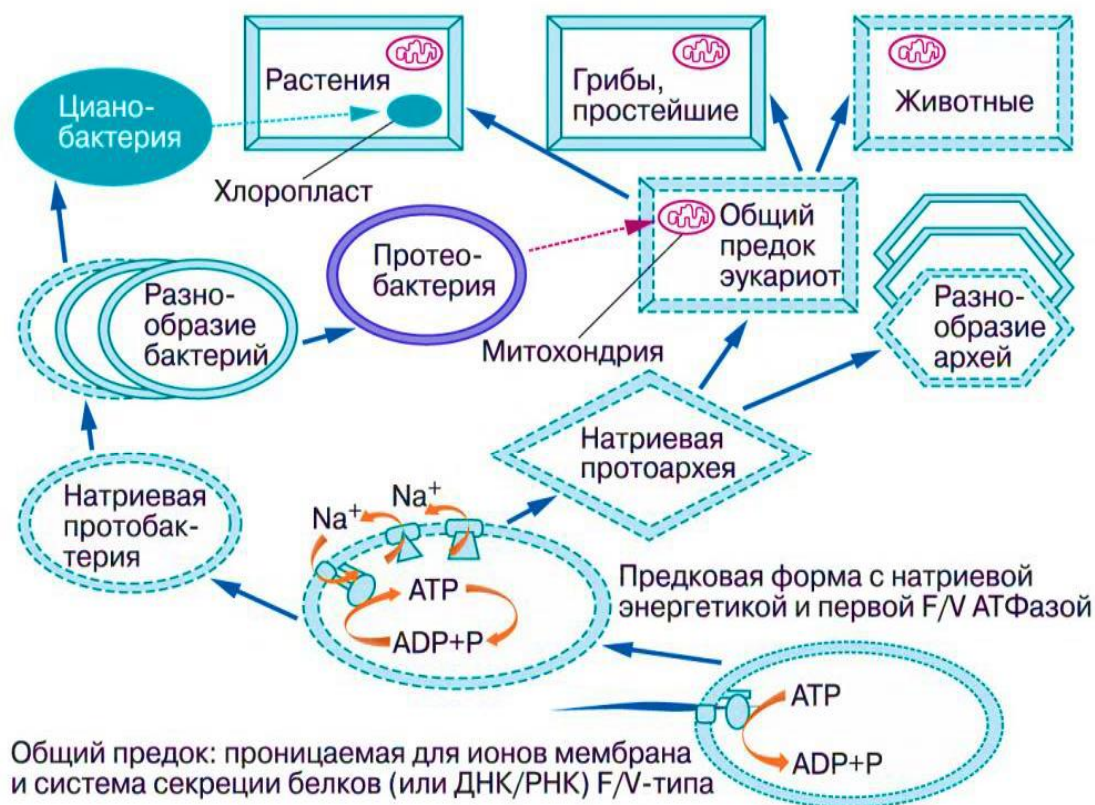


Рисунок 2. Схема предполагаемого развития мембранной биоэнергетики (Mulkiđjanian et al., Biol. Direct», 2008, 3, 13), показывающая переход от примитивных мембран, проницаемых для ионов Na^+ и H^+ (точечные линии), через мембраны, проницаемые для Na^+ (пунктирные линии), к мембранам, непроницаемым для протонов H^+ и Na^+ (сплошные линии). Пунктирные стрелки показывают симбиотические приобретения α -протеобактерий (пурпурная стрелка) и цианобактерий (зеленая стрелка) (Никитин М.А. 2013).

1.1.2 Структура и механизм действия F_0F_1 -АТФ-синтазы

АТФазы F-типа представляют собой высококонсервативные ферменты, используемые в основном для синтеза АТФ. F_0F_1 -АТФ-синтаза бактерий и хлоропластов содержит 8-9 субъединиц, соответственно (Borghese R. et al., 1998; Richter M.L. et al., 2000), в митохондриях 15, 17 различных субъединиц у млекопитающих и дрожжей (Wittig I. et al., 2008).

АТФ-синтаза *Escherichia coli* состоит из восьми различных субъединиц полипептидов в стехиометрии $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{10}$. Традиционно они были разделены на две физически разделяемые единицы: F_1 , которая катализирует гидролиз АТФ

($\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\epsilon$) и связанный с мембраной сектор F_0 , который транспортирует протоны (ab_2c_10). В терминах вращательной функции субъединицы можно разделить на субъединицы ротора ($\gamma\epsilon c_10$) и субъединицы статора ($\alpha_3\beta_3\delta ab_2$). Статор также включает периферийный стебель, состоящий из δ - и b - субъединиц, и часть протонного канала в субъединице a . Среди субъединиц ротора c -субъединицы образуют кольцо в мембране и взаимодействуют с субъединицей a для образования протонного канала. Субъединицы γ и ϵ связываются с субъединицами c -кольца, а также сообщаются с каталитическими сайтами посредством взаимодействия с α и β -субъединицами ([Vik S.B., 2007](#)).

F_1 часть (~380 кДа) является водорастворимой частью АТФ-синтазы. При изолировании от мембранного участка, действует как АТФ-привод двигателя: вращает внутреннюю субъединицу для гидролиза АТФ (Okuno D. et al., 2011). В состав F_1 части всегда входят пять субъединиц $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$, α - и β – субъединицы располагаются поочередно, формируя цилиндр вокруг биспиральной γ – субъединицы (рисунок 3).

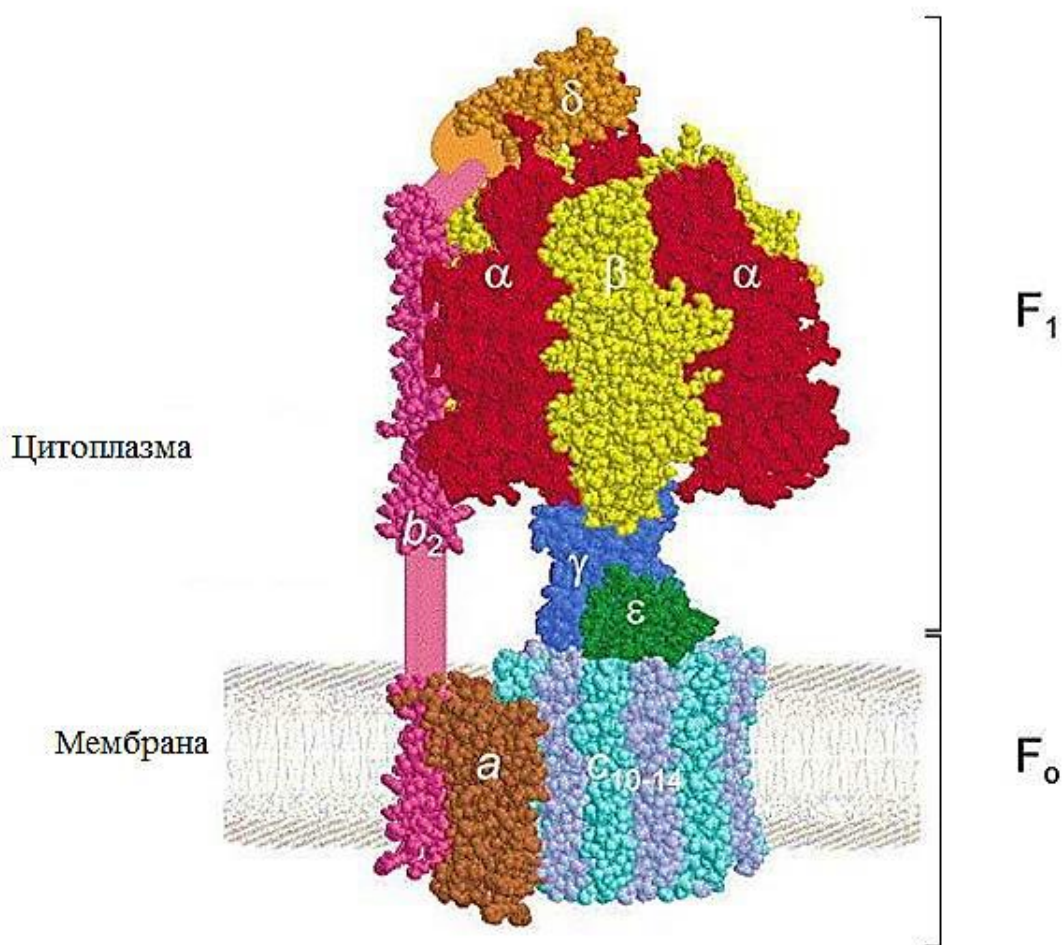


Рисунок 3: Бактериальный фермент (*Escherichia coli*), состоящий из α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ , b_2 , a , c_{10-14} субъединиц. Центральная ось включает γ и ϵ – субъединицы, периферический β и δ , протонный канал образован субъединицами $a c_{10-14}$. (Dabbeni-Sala F. et al., 2012)

Связывающий нуклеотиды центр, содержащийся в α – субъединице, играет важную регулируемую роль и оказывает влияние на F₁ – часть в каталитическом центре. При замене одного из остатков аминокислот в α -субъединице у FX-мутантов *Escherichia coli*: (Ser-373, Gly-351, Ser-375) резко изменялась кинетика F₁-АТФазы (Futai M. et al., 1989).

β -субъединица F₁-части содержит каталитический центр F₀F₁-АТФазы, включающий две точки связывания нуклеотидов - с высоким и с низким сродством, и точку, которая связывает неорганический фосфат (Ysern X. et al., 1988). Предлагают, что вращение β -субъединицы необходимо для генерации поворотного момента, участвующего во вращении γ -субъединицы (Watanabe R. et

al., 2013). Ранее было показано, что связывание АДФ-ингибитора H^+ -АТФазы с β -субъединицей происходит по каталитической точке субъединицы. К значительным изменениям кинетики гидролиза приводят даже единичные замещения аминокислот в β -субъединице F_1 –части у *E. coli* (Ala 151 - Val , Arg 246 – His, Gly 142 – Ser, Met 209 – He) (Futai M. et al., 1988).

Благодаря кристаллографическому анализу было выявлено, что β -субъединица имеет три конформации: закрытую β_t , промежуточную β_i , открытую β_e (рисунок 4).

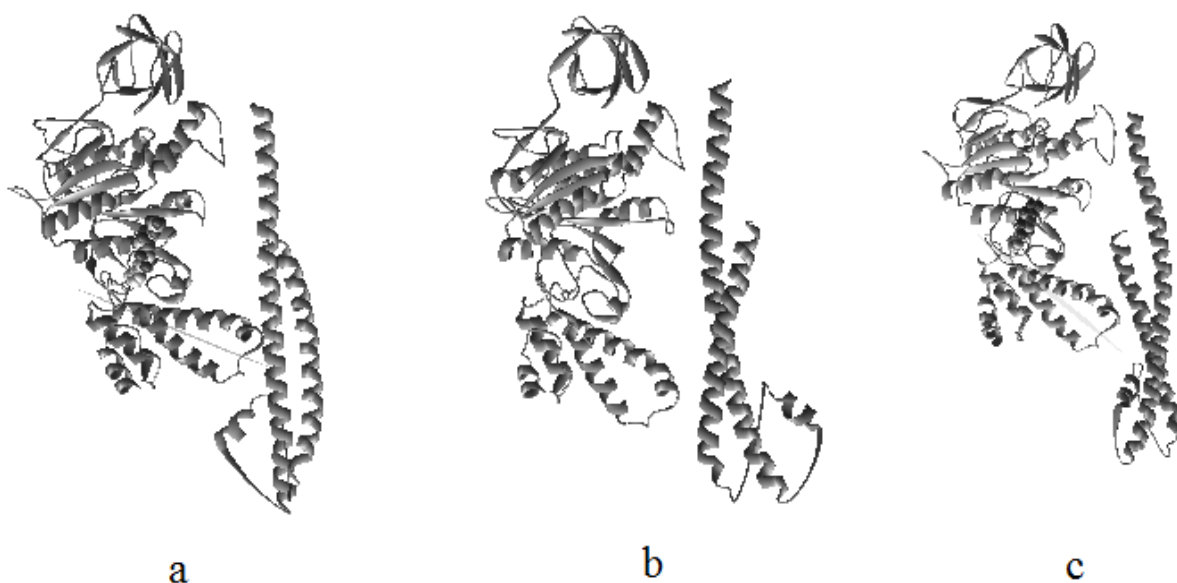


Рисунок 4: Различные конформации β и γ субъединиц: а — закрытая конформация β - субъединицы (β_t), связанная с MgАТР; b — открытая конформация (β_e) со свободным каталитическим центром; с — промежуточная конформация (β_i), связанная с MgАDP (Tikhonov A.N. et al., 2003).

Активный центр (АЦ) каталитической субъединицы в β_t конформации связан с АТФ, в β_i связан с АДФ, в β_e — пуст. Изменение этих конформаций и гидролиз АТФ приводят ротор центральной γ -субъединицы в движение, и, наоборот, вращение γ -субъединицы приводит к конформационным изменениям в каталитических субъединицах и синтезу АТФ (Tikhonov A.N. et al., 2003).

ϵ -субъединица связывается на выступающей части с γ -субъединицей и обеспечивает соединение между роторами частей F_1 и F_0 . ϵ -субъединица

действует как эндогенный ингибитор F_1 (Kato Y. et al., 1997; Smith J.B. et al., 1977; Sternweis P.C. et al., 1980), путем преобразования конформационного состояния с закрытой формы в открытую, которая блокирует вращение γ -субъединицы (Iino R. et al., 2005; Saita E. et al., 2010; Suzuki T. et al., 2003; Iino R. et al., 2009).

F_0 часть содержит разное количество a - и c - субъединиц и отвечает за ионно-мембранную транслокацию. Простейший вид присутствует в бактериях и состоит из субъединиц $a_{c_{10-14}}$. c -субъединицы образуют кольцевую структуру с разной стехиометрией, подключенную к F_1 центральной оси, образованной субъединицами γ и ϵ , причем последние субъединицы, гомологичные δ – субъединице митохондриального фермента (Vignais P.V. et al., 1984) и способны модулировать катализ (Suzuki T. et al., 2011). a – субъединица ассоциируется с c -кольцом по периферии и боковой ножке, которая формируется с помощью гомодимера субъединицы b и субъединицы δ , присутствующих в одном экземпляре и расположенных в верхней части F_1 (Walker J.E. et al., 2006) (рис. 3).

F_0F_1 – АТФ-синтаза сверхэффективный роторный двигатель, скорость синтеза АТФ превышает 100 молекул в секунду (Senior A.E. 2007). Для вращения "ротора", который состоит из c -кольца, механически связанного с субъединицами γ и ϵ , используется энергия трансмембранного электрохимического градиента. В результате вращения c -кольца вращается центральная ось, в свою очередь это приводит к синтезу АТФ из АДФ, что вызывает конформационные изменения в каталитических центрах. При потере мембранного потенциала фермент способен работать в направлении гидролиза АТФ, тем самым поддерживая формирование протонного градиента.(Dabbeni-Sala F. et al., 2012) (рисунок 5).

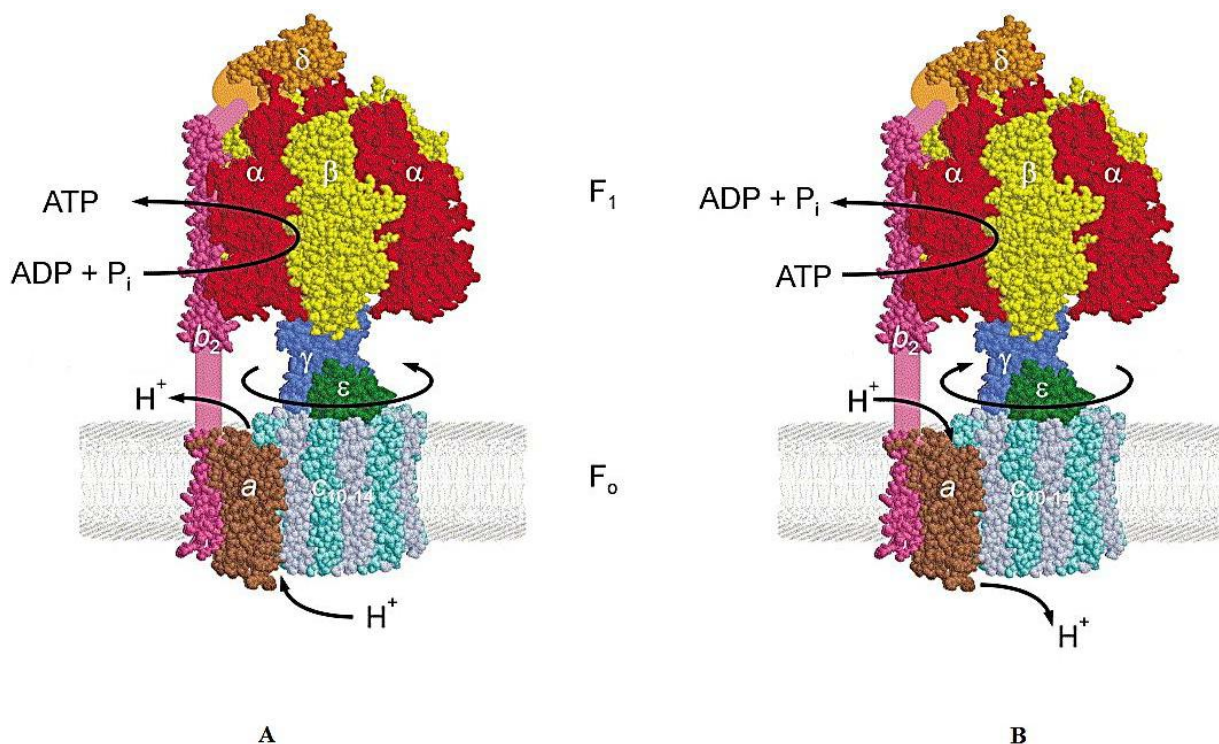


Рисунок 5. Схематическое изображение синтеза АТФ (А) и гидролиза F₀F₁ - АТФ-синтазы (В). (Dabbeni-Sala F. et al., 2012)

Более 10 лет назад была получена первая прямая визуализация АТФ – управляемого вращения F₁ у *Bacillus*, иммобилизованного на поверхности стекла с помощью N– концов β– субъединицы (Kato-Yamada Y. et al., 1998). Эти эксперименты показали, что флуоресцентная актиновая нить, прикрепленная к γ– субъединице, при добавлении АТФ, вращается однонаправленно (против часовой стрелки, со стороны мембраны). В дальнейшем использовались камеры с разрешением доли миллисекунд, чтобы обнаружить вращение золотого бисера, прикрепленного к γ – субъединице α₃β₃γ – подкомплекса, наряду с флуоресцентными изменениями гидролиза АТФ. Этот метод позволил отобразить в режиме реального времени связывание и высвобождение нуклеотидов в трех каталитических центрах одновременно с вращением γ-субъединицы (Adachi K. et al., 2007). Вращающийся зонд выдерживает паузу, что соответствует периоду, в течение которого АТФ связывается с пустым каталитическим центром, шаг вращения составляет 120°, состоит из двух субшагов, в течение которых происходит гидролиз и синтез АТФ. Одни молекулярные технологии были применены для всего F₀F₁ - комплекса из *Propionigenium modestum* и *E.coli*.

Вращение с использованием зондов, прикрепленных к с-кольцу в иммобилизованной F_0F_1 , как и ожидалось, произошло в противоположном направлении, когда вращение с-кольца было обусловлено АТФ или протонным потоком (Ueno H. et al., 2005).

1.1.3 F_0F_1 -АТФ-синтазный оперон бактерий

Бактериальные АТФ-синтазы чаще всего кодируются в одиночных оперонах, которые содержат восемь структурных генов *atp* BEFHAGDC, расположенных под одним промотором, кодирующих следующие субъединицы: *atpB* (а-субъединица), *atpE* (с-субъединица), *atpF* (b-субъединица), *atpH* (δ -субъединица), *atpA* (α -субъединица), *atpG* (γ -субъединица), *atpD* (β -субъединица), *atpC* (ϵ -субъединица) (рисунок 6) (Hicks D.V. et al., 2010).

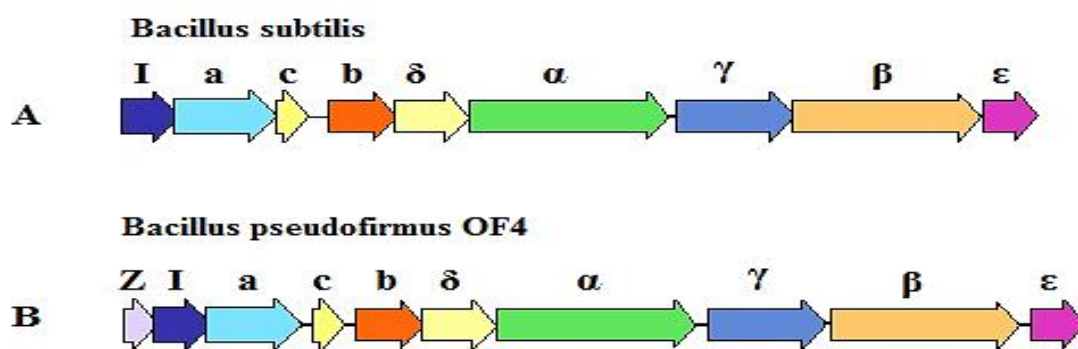


Рисунок 6. Схематическое изображение оперона *Bacillus subtilis* (A), *Bacillus pseudofirmus* OF4 (B) (Hicks D.V. et al., 2010).

Некоторые бактерии, в том числе *Rhodospirillum rubrum* и цианобактерии *Synechococcus*, имеют различные опероны для генов, кодирующих белки F_0 и F_1 , что согласуется с гипотезой развития генов двух доменов в виде отдельных модулей (Falk G. et al., 1985; Falk G. et al., 1988). В этих бактериях существуют два гомологичных гена, кодирующих две b-субъединицы (Falk G. et al., 1988). В других бактериальных оперонах существуют различные последовательности генов, например, *atpEBFHAGDC* в *Streptococcus mutans* и *Streptococcus sanguis* (Kuhnert W.L. et al., 2003). В большинстве бактериальных АТФ-оперонах, перед

восьмью структурными генами АТФ-синтазы расположен девятый ген, кодирующий регуляторный белок AtpI. Это ген *atpI*, который кодирует гидрофобный белок, предположительно имеющий 4 трансмембранные спирали (ТМН). Последовательность белка AtpI не высоко консервативна у различных видов. В некоторых случаях *atpI* находится под контролем отдельного промотора других генов АТФ (Barriuso-Iglesias M. et al., 2006), либо полностью отсутствует (Kullen M.J. et al., 1999), а другой ген с неизвестной функцией выполняет функцию *atpI* (Gaballo A. et al., 2006). Примером отсутствия гена *atpI* служит оперон АТФ-синтазы *Lactobacillus acidophilus* (рисунок 7) (Kullen M.J. et al., 1999).

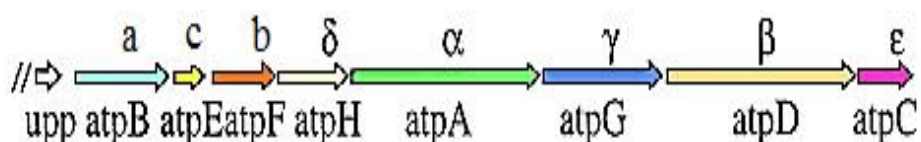


Рисунок 7: Схематическое изображение оперона *L.acidophilus*.

В оперонах АТФ-синтаз *B. subtilis* и *L. acidophilus* начальным генам *atpI* и *atpB*, соответственно, предшествует ген *upp* (Hicks D.V. et al., 2010; Kullen M.J. et al., 1999).

Gay и Walker предложили функцию шаперона для белка AtpI, когда впервые описали ген *atpI* (Gay N.J. et al., 1981). Также была отмечена частичная гомология AtpI и дрожжевых белков с функциями мембранной сборки (Deckers-Hebestreit G. et al., 1996; Rak M. et al., 2008). Ранее была продемонстрирована функция шаперона для белка AtpI (Suzuki T. et al., 2007; Ozaki Y. et al., 2008). Степень вклада AtpI в сборку с-ротора в естественных бактериальных условиях пока не ясна. Делеции гена *atpI* в *E. coli* приводили к снижению экспрессии, но мутанты сохраняли значительную способность к неферментативному росту, что требует активности АТФ-синтазы (Gay N.J. et al., 1984; von Meyenburg K. et al., 1982). Удаление *atpI* в алкалофильной *Bacillus pseudofirmus* OF4 аналогичным образом не оказывало существенного влияния на условия культивирования, за

исключением специфических ионных условий (Hicks D.V. et al., 2003). AtpI может играть менее доминирующую роль, чем члены семейства шаперонов YidC, которые играют роль в сборке с- и b-субъединиц в *E. coli* (Kol S. et al., 2009; van der Laan M. et al., 2004). Вероятно, относительная важность роли шаперона AtpI варьируется среди бактерий в зависимости от определенных условий.

Перед геном *atpI* АТФ-оперон алкалофильного *B. pseudofirmus* OF4 имеет открытую рамку считывания, обозначенную как *atpZ* (рис. 4B) (Boyer P.D. et al., 1997). Ген *atpZ* *B. pseudofirmus* OF4 продуцирует гидрофобный белок, который, как полагают, содержит 2 трансмембранные спирали. Ген *atpZ* имеет множество гомологов у грамположительных бактерий с низким гуанин-цитозиновым (ГЦ) составом. Такой ген еще не наблюдался в оперонах лактобацилл, стафилококков, стрептококков, микоплазм. Это свидетельствует о том, что функция белка AtpZ связана с физиологией конкретных представителей грамположительных бактерий. В 5 геномах грамположительных бактерий с высоким гуанин-цитозиновым составом, между генами *atpI* и *atpB*, обнаружили ген, предположительно кодирующий гидрофобный белок, сходный с бактериальными пермеазами (Gaballo A. et al., 2006).

1.1.4 Консервативность и вариабельность субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы бактерий

Учитывая древнее происхождение F₀F₁-АТФ-синтазы, построение филогенетических деревьев может стать ключевым моментом при проведении анализа эволюционных отношений у различных бактерий. Субъединицы α и β состоят из длинных белковых последовательностей, которые медленно эволюционируют, поэтому они являются наиболее консервативными.

Порядок генов, кодирующих субъединицы F₀F₁-АТФ-синтазы в целом относительно хорошо сохраняется у большинства видов бактерий, хотя локус был разделен неоднократно и гены *atpF1B* и *atpF1E* располагались либо против хода транскрипции (в N-АТФ-азах и у *Bacteroides fragilis*), или, чаще всего, по ходу

транскрипции. У некоторых видов наблюдается дупликация каждой субъединицы АТФ-синтазы либо в генетическом локусе, либо в отдаленных частях генома. Более того, *atpF0B* функционирует как димер, даже у видов, где существует только одна копия в геноме, и две части димера взаимодействуют с различными частями F_1 и F_0 подкомплексов (Brandt K. et al., 2013; Gajadeera C.S. et al., 2013). Соответственно, дупликация генов, которая позволяет точно настроить специфические взаимодействия каждой копии гена, может действительно быть выгодной. Следует отметить, что *atpF0B/0B9* цианобактерий может быть успешно внедрена в *E.coli* (в которой отсутствует *atpF0B/0B9*) и образовывать гетеродимеры, которые собираются с остальными нативными субъединицами АТФ-синтазы, образуя функциональный фермент. Это еще раз указывает на гибкость АТФ-синтазы различных видов, с учетом приспособления и дупликации (Koumandou V.L. et al., 2014).

Сравнительный биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы актинобактерий показал, что структура оперона всех видов сходна. Субъединицы α и β консервативны, а наиболее переменные участки наблюдались лишь в с-концевой части последовательности этих субъединиц, а также в первых 40 аминокислотных остатках β -субъединицы. Менее консервативными являются δ - и γ -субъединицы. Так, например, процент идентичности субъединиц α и β у разных представителей актинобактерий, не опускается ниже 70%, тогда как процент идентичности субъединицы γ лежит в интервале от 78% до 33%, а субъединицы δ в интервале от 71% до 30% (рисунок 8) (Алексеева М.Г. и др., 2015).

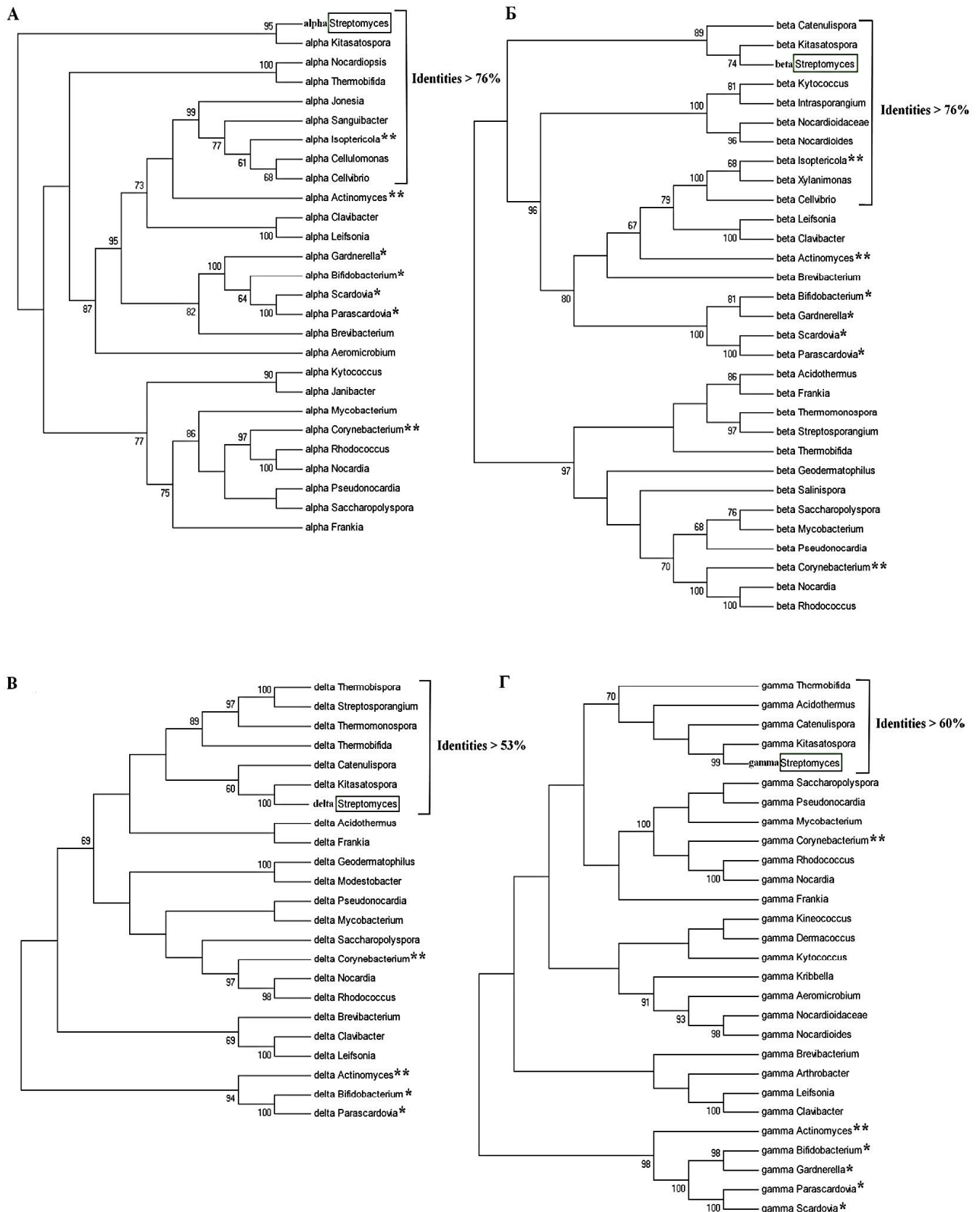


Рисунок 8. Филогенетические деревья, основанные на сравнении аминокислотных последовательностей четырех субъединиц F₁-части F₀F₁-АТФ-синтазного оперона у актинобактерий. А) α-субъединица F₁-части F₀F₁-АТФ-синтазного оперона. Б) β-субъединица F₁-части F₀F₁-АТФ-синтазного оперона. В) γ-субъединица F₁-части F₀F₁-АТФ-синтазного оперона. Г) δ-субъединица F₁-части F₀F₁-АТФ-синтазного оперона.

оперона. В) δ -субъединица F_1 -части F_0F_1 - АТФ-синтазного оперона. Г) γ -субъединица F_1 -части F_0F_1 - АТФ-синтазного оперона (Алексеева М.Г. и др., 2015).

1.1.5 Функции F_0F_1 -АТФ-синтазы

До недавнего времени полагали, что комплекс F_0F_1 -АТФ-синтаза локализован исключительно в митохондриях. Позже на наружной поверхности плазматической мембраны были обнаружены компоненты АТФ-синтазы. В то время как митохондриальные синтазы использует протонный градиент, создаваемый окислительным фосфорилированием, в ходе энергетического синтеза АТФ, синтазы клеточной поверхности участвуют в многочисленных процессах, в том числе регуляции внутриклеточного рН, в клеточном ответе на антиангиогенные агенты и в гомеостазе холестерина. Недавние исследования АТФ-синтазы на клеточной поверхности, демонстрируют её участие в регуляции уровня холестерина в сыворотке крови, клеточной пролиферации и противоопухолевой терапии. (Chi S.L. et al., 2006).

Идентификация АТФ-синтазы в качестве основного ангиостатин-связывающего сайта на поверхности клеток эндотелия предполагает, что метаболизм АТФ может участвовать в ангиостатическом ответе. Ингибирование эндотелиальной клеточной поверхности АТФ-синтазы с использованием анти-АТФазных антител имитировал антипролиферативное действие ангиостатина на эндотелиальные клетки. Этот результат позволяет предположить, что синтез АТФ в сочетании с переносом протонов может способствовать поддержанию эндотелиального гомеостаза клеток. АТФ-синтаза также присутствует на внешней поверхности многих раковых клеток, в том числе легких, печени и клеток рака молочной железы. Результаты показывают, что АТФ-азы могут быть полезны в качестве новой терапевтической мишени рака (Zhang X. et al., 2008).

В то время как основная структура АТФ-синтазы и ее механизм поворотного катализа сохраняются во всех трех царств жизни, встречаются

уникальные возможности фермента у некоторых организмов, являющиеся адаптациями к конкретным условиям. Примером являются патогенные бактерии, синтез АТФ у которых протекает в условиях низкого содержанием кислорода и/или при ограничениях питательных веществ, например в отдаленных частях легких человека или внутри человеческих макрофагов. В частности, *M.tuberculosis* и другие штаммы рода *Mycobacterium*, таких как *Micobacterium lepra* и *Micobacterium ulcerans*, могут находиться в организме человека, в течение многих лет (Cosma C.L. et al., 2003; Koul A. et al., 2011). Эти штаммы микобактерий могут находиться в состоянии покоя, при котором практически отсутствует репликация, увеличивается толщина клеточной стенки, значительно подавляется синтез белка и нуклеиновых кислот, и липидный обмен, по-видимому, является основным источником энергии (Wayne L.G. et al., 2001; Timm J. et al., 2003). Специализированные ниши, в которых проживают микобактерии, могут требовать адаптации в энергетическом метаболизме, чтобы обеспечить достаточное количество АТФ и генерацию протонно-движущей силы (PMF), а АТФ-синтазы этих бактерий выполнять специализированные функции, необходимые для выживания.

Трансмембранные АТФазы импортируют многие метаболиты, необходимые для обмена веществ в клетках и экспортируют токсины, переработанные вещества, которые могут препятствовать клеточным процессам. АТФазы бактериальной мембраны катализируют синтез АТФ, связанный с дыханием, АТФ-зависимое трансгидрирование и АТФ-зависимый перенос растворенного вещества через цитоплазматическую мембрану (Beyenbach K.W. et al., 2006; Müller V., Lingl A. et al., 2005).

F₀F₁-АТФ-синтазы были идентифицированы у многих бактерий, включая актинобактерии родов *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, хорошо охарактеризованы и подходят для проведения сравнительных исследований (Алексеева М.Г. и др., 2015).

1.1.6 Особенности F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces*

Streptomyces - род грамположительных бактерий, распространённый в различных средах обитания, образующий разветвлённый мицелий. Наиболее интересным свойством *Streptomyces* является способность продуцировать биологически активные вторичные метаболиты, такие как противогрибковые, противовирусные, противоопухолевые, антигипертензивные средства, иммунодепрессанты и особенно антибиотики. *Streptomyces* отличаются высокой скоростью производства метаболитов и процессов биотрансформации. Хорошо изученные виды *Streptomyces* широко используются в генетических исследованиях (Procópio R.E. et al., 2012).

Ключевую роль в энергетическом обмене *Streptomyces* играют АТФ-синтазы. По составу субъединиц, молекулярной массе и стехиометрии F₀F₁-АТФ-синтаза *Streptomyces* напоминает комплекс, обнаруженный в *E. coli*. АТФ-оперон F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces lividans* ТК24 содержит гены, расположенные в следующей последовательности: *atpV* (а-субъединица), *atpE* (с-субъединица), *atpF* (b-субъединица), *atpH* (δ-субъединица), *atpA* (α-субъединица), *atpG* (γ-субъединица), *atpD* (β-субъединица), *atpC* (ε-субъединица) (рисунок 9).

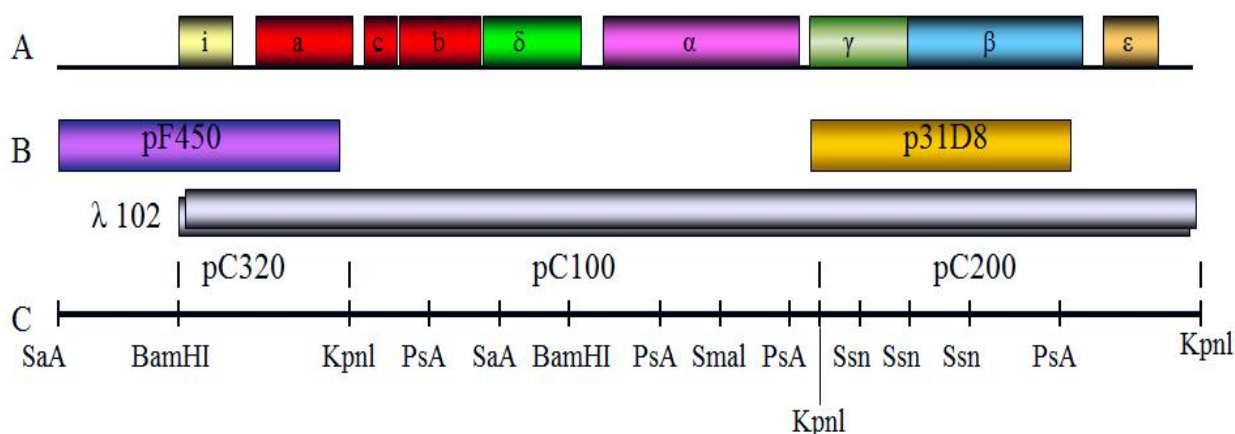


Рисунок 9. Кластер из 9 генов (*atp*-оперон) F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces lividans* ТК24 (Алексеева М.Г. и др., 2015).

Несмотря на большое сходство с другими бактериями, F₀F₁-АТФ-синтазы актинобактерий отличаются зависимостью активности фермента от ионов Ca²⁺

(Hensel M. et al., 1991; Hensel M., Ahmus H. et al., 1991) и чувствительностью к антибиотику олигомицину А (Shcherina L.A. et al., 2002). Различные ингибиторы F_0F_1 -АТФ-синтазы бактерий и человека, в том числе и антибиотики семейства олигомицинов, рассматриваются как потенциальные лекарственные препарат (Hong S. et al., 2008).

Макролидные антибиотики семейства олигомицинов синтезируются многими представителями рода *Streptomyces*. Штаммы - продуценты являются устойчивыми к действию олигомицинов, прочие же представители *Streptomyces* имеют различную чувствительность, механизм которой остается практически не изученным (Алексеева М.Г. и др., 2009; Enomoto Y. et al., 2001; Даниленко А.Н. и др., 2012; Kim B. S. et al., 1999). Уровень чувствительности F_0F_1 -АТФ-синтазы *Streptomyces lividans* ТК24 (*S.lividans*) к олигомицину А соответствует уровню чувствительности F_0F_1 -АТФ-синтазы человека (доза $>0,1$ нмоль/мл олигомицина А), а F_0F_1 -АТФ-синтаза *Streptomyces fradiae* АТСС 19609 (*S.fradiae*) является сверхчувствительной (доза $<0,001$ нмоль/л), что делает этот штамм удобным модельным объектом для исследований (Alekseeva M.G. et al., 2009).

На примере *Streptomyces fradiae* АТСС 19609 была показана зависимость АТФазной активности мембраносвязанного F_0F_1 -комплекса от ионов Mg^{2+} , стимуляция ионами Ca^{2+} , а также фосфорилирование F_0F_1 -АТФ-синтазы эндогенными Ca^{2+} -зависимыми серин-треониновыми протеинкиназами (СТПК) (Alekseeva M.G. et al., 2009).

1.2 Фосфорилирование АТФ-синтазы

В ходе эволюции, для лучшей адаптации к условиям среды, в клетках развивались системы, способные воспринимать, передавать, хранить и интерпретировать информацию таким образом, чтобы регулирующий механизм мог скоординировать своевременный ответ. Было описано более 200 ПТМ белков, включая фосфорилирование, убиквитинирование и ацетилирование, которые служат в качестве преобразователей подобных сигналов. Важными

особенностями этих модификаций белка являются их быстрый и обратимый характер, относительно небольшие метаболические затраты и способность модулировать функцию целевого белка (Cohen P. 2002).

ПТМ представляют собой химический инструмент для модуляции активности F_0F_1 -АТФазы в ответ на различные раздражители. Некоторые ПТМ необходимы для обеспечения ферментативного катализа или, наоборот, для инактивации ферментной функции. Каждая ковалентная модификация F_0F_1 -АТФазы, возникающая в ответ на локальные изменения, является результатом селективного молекулярного механизма, который, переводя химическую модификацию в биохимический эффект, гарантирует настройку фермента в изменяющихся условиях. Некоторые ПТМ могут использоваться для модуляции лекарственного эффекта или представляют собой перспективные инструменты для терапевтических стратегий, ориентированных на F_0F_1 -АТФазы. Самый известный механизм регулирования – это фосфорилирование. Фосфорилирование наиболее распространено, изучено и тесно связано практически с каждым клеточным процессом (Nesci S. et al., 2017).

Важнейшей частью метаболизма является окислительное фосфорилирование – процесс синтеза АТФ. Этот метаболический путь, вероятно, настолько распространен, что он является высокоэффективным способом высвобождения энергии по сравнению с альтернативными процессами ферментации, такими как анаэробный гликолиз. У эукариот эти окислительно-восстановительные реакции осуществляются рядом белковых комплексов на внутренней мембране митохондрий клетки, тогда как в прокариотах эти белки расположены в межмембранном пространстве клеток. Такие множества белков, связанные между собой, называются электронными транспортными цепями. У эукариот задействованы пять основных белковых комплексов, тогда как в прокариотах присутствуют много разных ферментов с использованием множества доноров и акцепторов электронов. Энергия, выделяемая электронами, протекающими через электронную транспортную цепь, используется для

переноса протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Происходит накопление потенциальной энергии в виде градиента рН и электронного потенциала на мембране. Этот запас энергии высвобождается, при обратном прохождении протонов через мембрану и по потенциальному градиенту энергии через фермент АТФ-синтазу (Oxidative phosphorylation: https://en.wikipedia.org/wiki/Oxidative_phosphorylation).

Фосфорилирование белка является важным процессом, посттрансляционной модификации белков, где аминокислотный остаток фосфорилируется протеинкиназой путем добавления ковалентно связанной фосфатной группы. Фосфорилирование изменяет структурную конформацию белка (активируя, дезактивируя) или его функцию. Обратная реакция фосфорилирования называется дефосфорилированием и катализируется белковыми фосфатазами. Протеинкиназы - фосфотрансферазы, модифицирующие белки путем фосфорилирования, и фосфатазы работают независимо друг от друга (Smoly I. et al., 2017).

1.2.1 Механизмы и функции фосфорилирования белков

Для белков, проявляющих ферментативную активность, фосфорилирование - практически универсальный механизм регулирования функций. Фосфорилирование белков участвует в регуляции цикла Кребса, трансляции, транскрипции, распаде гликогена, транспорте веществ, передаче сигналов в клетке, и многих других процессах. Путем фосфорилирования и дефосфорилирования белков, участвующих в энергетических преобразованиях, может осуществляться регуляция функций митохондрий (Nichols V.J. et al., 1995; Hansford R.G. 1994).

Предположительно, фосфорилирование влияет на структуру белка, изменяя взаимодействия с соседними аминокислотами. Некоторые белки содержат множественные сайты фосфорилирования, что облегчает комплексное многоуровневое регулирование. Из-за легкости, с которой белки могут быть фосфорилированы и дефосфорилированы, этот тип модификации является

наиболее гибким механизмом, позволяющим клеткам реагировать на внешние сигналы и условия окружающей среды (Johnson L.N. et al., 1993).

Развитие современной протеомики привело к открытию сайтов фосфорилирования и метаболических схем в различных организмах (Oliveira A.P. et al., 2012; Grimsrud P.A. et al., 2012; Zhao X. et al., 2011; Robitaille A.M. et al., 2013). Связывание метаболических ферментов в сложные сети передачи сигналов, подчеркивает важность изучения их, как терапевтически нацеленных на лечение метаболических заболеваний. Выделяют два основных механизма, посредством которых фосфорилирование контролирует функцию белка: модулирование белково-белковых взаимодействий и изменение конформации белка, что достигается путем ковалентного присоединения фосфатных групп к остаткам серина, треонина и тирозина протеинкиназами и их удалению белковыми фосфатазами. Фосфорилирование, таким образом, функционирует как место стыковки для внутри- или межмолекулярных белковых взаимодействий и может непосредственно модулировать ферментативную активность путем изменения конформации белка. Таким образом, фосфорилирование белков киназами и фосфатазами служит быстрым (временной интервал: от миллисекунд до нескольких секунд) молекулярным переключателем, способным прямо или косвенно изменять поведение его мишеней (Humphrey S.J. et al., 2015).

1.2.2 Фосфорилирование белков у эукариот и прокариотов

Фосфорилирование белка у эукариотов участвует в клеточной передаче сигналов, экспрессии и дифференцировке генов, репликации ДНК во время клеточного цикла и в стресс-индуцированных механизмах. По сравнению с эукариотами прокариоты используют киназы и фосфатазы Хэнкс-типа для передачи сигналов (Kenelly P.J. 2017).

По сравнению с фосфорилированием белка прокариот, исследования у эукариот от дрожжей до клеток человека ведутся довольно обширно. В то время как серин, треонин и тирозин фосфорилируются у эукариот, гистидин и аспарат

фосфорилируются у прокариот, растений и неапикальных эукариот. В бактериях фосфорилирование гистидина происходит в фосфоенолпируват-зависимых фосфотрансферазных системах, которые участвуют в процессе интернализации, а также в фосфорилировании сахаров (Masek V. et al., 2007).

Фосфорилирование белка протеинкиназой было впервые показано в *E. coli* и *Salmonella typhimurium*, а в последующем и во многих других бактериальных клетках (Cozzone, A.J. 1988). Было обнаружено, что бактерии используют фосфорилирование гистидина и аспартата в качестве модели бактериальной сигнальной трансдукции, но в последние несколько лет появились данные, свидетельствующие о том, что также присутствует в бактериях фосфорилирование серина, треонина и тирозина. Было показано, что бактерии содержат киназы и фосфатазы, не только похожие, но и уникальные, не обнаруженные у эукариот (Masek V. et al., 2007). Протеинкиназы играют ключевую роль в регуляции, в том числе в работе сигнальных систем клеток (Schenk P.W. et al., 1999). Исследования протеолипосомного комплекса *S.fradiae* ATCC 19609 показало, что СТПК способны модифицировать субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы (Алексеева М.Г. и др., 2009).

1.2.3 Фосфорилирование субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы

Обилие сайтов фосфорилирования F₀F₁-АТФазы, а именно 67 различных сайтов фосфорилирования на 12 субъединицах, сразу же указывает на то, что этот вид ПТМ играет важную роль в регулировании функций фермента (Nesci S. et al., 2017).

F₀F₁-АТФ-синтаза подвержена фосфорилированию на остатках тирозина, серина и треонина, но функциональная роль этих модификаций не до конца понятна. Фосфорилирование может иметь дифференциальное влияние на конформацию, каталитическую активность, сборку субъединиц, образование димера и стабильность F₀F₁-АТФ-синтазы. Кроме того, фосфорилирование или дефосфорилирование могут служить сигналом для диссоциации и / или

деградации этого комплекса. Киназы и фосфатазы, участвующие в фосфорилировании и дефосфорилировании отдельных субъединиц F_0F_1 -АТФазы, мало изучены (Nowak G. et al., 2015).

Гидрофильный домен F_1 содержит большинство сайтов фосфорилирования, поэтому является основным регулятором катализа. Трансмембранные субъединицы c, e, f и A6L также содержат сайты фосфорилирования, тогда как 3 сайта фосфорилирования встречаются на вспомогательной субъединице IF1 и факторе В в клетках лимфомы человека, но их физиологическая роль до сих пор неизвестна (Højlund K. et al., 2003). Два сайта фосфорилирования на IF1 (Ser-39 и Ser-63), присутствующие у человека, не сохраняются у других видов. По-видимому, сайт фосфорилирования Ser-39 регулирует связывание ингибитора IF1, белка, который блокирует гидролиз АТФ (Covian R. et al., 2012), когда физическая потребность в перекачивании протонов F_0F_1 -АТФазы физиологически не требуется. Фосфорилирование Ser-39 в N-концевой области предотвращает связывание α -спирали IF1 с β -субъединицей. С другой стороны, клеточная роль фосфорилирования Ser-63 в C-концевой области неизвестна (Gledhill J.R. et al., 2007). Связь между фосфорилированием F_0F_1 -АТФазы и изменениями ферментной функции также в значительной степени неясна. Соответственно, функции большинства сайтов фосфорилирования пока мало изучены, даже если их местоположение указывает на непосредственное влияние на катализ F_0F_1 -АТФазы. Действительно, некоторые аминокислотные остатки (Ser или Thr) изменяют уровни фосфорилирования в соответствии с физиологическим состоянием клеток. Установлено, что фосфорилирование α - и β -субъединиц является необходимым фактором, для активации каталитической функции (Kane L. A. et al., 2010; Reinders J. et al., 2007). Сайты фосфорилирования в α -субъединице состоят только из остатков Ser или Thr. В изолированных митохондриях мыши эти аминокислотные остатки в N-концевой области важны для установления взаимодействия с субъединицей OSCP статора (Rees D.M. et al., 2009). Фосфорилирование Ser-остатка α -субъединицы в закрытом контакте с β -

субъединицей в F_0F_1 -АТФ-синтазе свиней, мышиноного сердца и человеческих мышцах (Zhao X. et al., 2011; Voja E. S. et al., 2009; Huttlin E.L. et al., 2010) возрастает, когда митохондрии активируются подачей АТФ. Но только α Ser-184, α Ser-419 и α Thr-432 участвуют во время закрытия каталитического сайта. В β – субъединице F_0F_1 -АТФ-синтазы кролика фосфорилирование остатков β Ser-106, β Ser-263 и β Thr-312, β Thr-368 обеспечивает сборку моноблочного F_0F_1 -комплекса. Кроме того, фосфорилирование остатков β Ser-106 и β Ser-263 изменяют сборку димеров и уменьшает активность F-АТФазы, тогда как фосфорилирование β Thr-312 блокирует F-АТФазу. Однако ни одна из этих аминокислот не является частью каталитического сайта. Связь между структурными изменениями и функциональными последствиями была показана на дрожжах (Reinders J. et al., 2007). Кроме того, фосфорилирование Tyr-52 γ -субъединицы с помощью внутри- или межсубъединичных фосфатных взаимодействий могло бы изменить механизм кручения, необходимый для конформационных изменений гексамера $\alpha_3\beta_3$, предотвращающего вращение ротора (Di Pancrazio F. et al., 2006). Предполагается, что участки фосфорилирования на субъединицах периферических стеблей модулируют гибкость статора или димеризацию фермента (Davies K.M. et al., 2012). Фосфорилирование с-субъединицы протеинкиназой А (РКА) стимулирует активность F_0F_1 -АТФазы, в то время как Ca^{2+} и CsA-чувствительное дефосфорилирование способствует увеличению проницаемости митохондрий (mPTP) (Azarashvili T. et al., 2014). Более того, фосфорилирование Ser остатка на g-субъединице может регулировать димеризацию фермента в дрожжах (Reinders J. et al., 2007), тогда как фосфорилирование Tyr-52 γ -субъединицы связано с димеризацией F_0F_1 -АТФазы в митохондриях головного мозга (Di Pancrazio F. et al., 2006). Другими словами, восприимчивые аминокислоты различны, но значение фосфорилирования резко меняет химические взаимодействия между субъединицами (Nesci S. et al., 2017).

Фосфорилирование γ -субъединицы на разных аминокислотных остатках может стабилизировать или дестабилизировать структуру домена F_1 , а также весь

комплекс АТФ-синтазы в зависимости от того, где происходит фосфорилирование. Помимо фосфорилирования γ -субъединицы в митохондриях было также показано фосфорилирование α и/или β – субъединиц (Nowak G. et al., 2015).

Наиболее известно фосфорилирование каталитической β -субъединицы домена F_1 , способствующее патогенезу диабета 2 типа. (Højlund K. et al., 2003). На модельной системе дрожжей показано, что мутации, имитирующие фосфорилирование специфических сериновых и треониновых остатков β -субъединицы F_0F_1 -АТФазы, имеют последствия для функций, структуры и сборки комплекса АТФ-синтазы. Фосфорилирование β -субъединицы может блокировать функцию АТФазы, изменять стабильность F_1 - домена АТФ-синтазы или индуцировать димеризацию F_0F_1 – комплекса (Kane L. A. et al., 2010). Аналогично, фосфорилирование γ -субъединицы связано с образованием F_1 -димеров (Di Pancrazio F. et al., 2006; Kane L. A. et al., 2006). Показано фосфорилирование α - и γ -субъединиц (Voja E. S. et al., 2009; Hüttemann M. et al., 2007; Hüttemann M. et al., 2008), а также δ -субъединицы F_1 -домена F_0F_1 -АТФазы в ответ на стимуляцию тромбоцитарного фактора роста в кортикальных нейронах (Zhang F. X. et al., 1995) и других типах клеток (Ko Y. H. et al., 2002). Описано фосфорилирование изолированной β -субъединицы почечной F_0F_1 -АТФазы *in vitro* (Liu X. et al., 2004).

1.3 F_0F_1 -АТФ-синтазы бактерий – как биомишень действия олигомицина

Макролидный антибиотик олигомицин А был обнаружен в 1954 году (Smith R. M. et al., 1954). Он является известным ингибитором F_0 -части H^+ -АТФ-синтазы и широко используется для исследований митохондриальной F_0F_1 -АТФазы (Lysenkova L.N. et al., 2017). Олигомицин был признан мощным ингибитором митохондриальной АТФ-синтазы в 1958 года (Lardy H.A. et al., 1958).

По строению олигомицин А представляет собой 26-членный α,β -ненасыщенный лактон, сочлененный с бициклической спирокетальной структурой (Carter G.T. 1986) (рисунок 10).

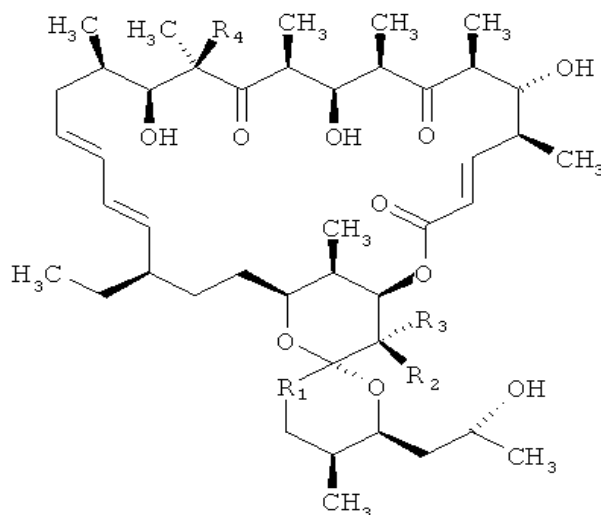


Рисунок 10. Химическая структурная формула олигомицина А (Lysenkova L.N. et al., 2017).

Механизм действия макролидных антибиотиков группы олигомицинов хорошо изучен и основан на взаимодействии с F_0 -комплексом F_0F_1 -АТФ-синтазы митохондрий эукариотов и цитоплазматического комплекса F_0F_1 -АТФ-синтазы некоторых актинобактерий. Существует предположение, что у данной группы антибиотиков могут быть другие биомишени (Wender P.A. et al., 2006).

Олигомицин является мощным ингибитором окислительного фосфорилирования, широко используется в экспериментальных исследованиях АТФ-синтазы (Altamura N. et al., 1996; Cho H.J. et al., 1997).

1.3.1 Химические модификации олигомицина А

Важнейшим способом получения новых препаратов является химическая модификация антибиотиков. На сегодняшний день были проведены неоднократные модификации антибиотиков группы олигомицинов. Например, частичное ацетилирование олигомицина А, с установлением полной структуры соединений. Полученные производные не проявили ингибирующей активности при тестировании на спорах *Aspergillus niger* (László Szilágyi et al., 1995). Описаны способы модификаций, селективно изменяющих кетонную группу и двойные

связи в молекуле олигомицина А, полученные производные отличались более низкой токсичностью (Lysenkova L.N. et al., 2010). Исследовалась реакционная способность кето-групп олигомицина. Полученные соединения ингибировали АДФ-зависимое дыхание и выброс протона при гидролизе АТФ, но не оказывали влияния на другие процессы, связанные с дыханием в интактных митохондриях печени крыс (Rfmires F. et al., 1982). Наиболее активно ведется работа по получению производных олигомицина А в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе. Разработаны методы селективной модификации олигомицина А (рисунок 11), а также были отобраны производные для исследования механизма действия (Омельчук О.А и др., 2015).

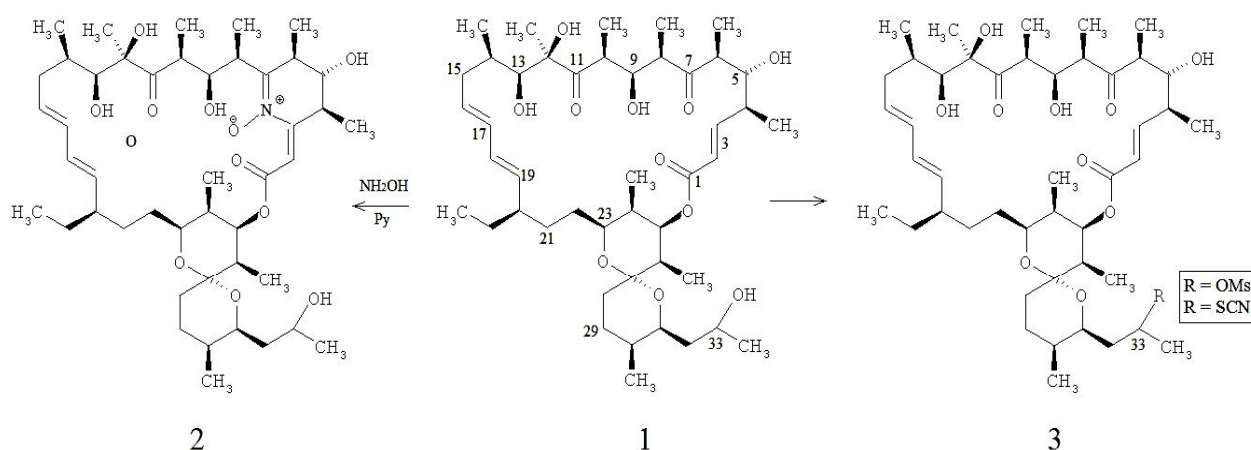


Рисунок 11. Производные олигомицина А (1): нитроолигомицин А (2), 33-О- мезилолигомицин и тиоционат олигомицина А (МОБИХим 2015).

Активность синтезированных производных измерялась при помощи использования тест-системы «для скрининга новых природных антибиотиков и их полусинтетических производных» на основе штамма *S. fradiae* ATCC 19609 (МОБИХим 2015). В ходе экспериментов было установлено, что полученные производные имели сниженную активность, а некоторые из них и наименьшую токсичность по сравнению с олигомицином А (Омельчук О.А и др., 2015).

Для исследования функционирования F_0F_1 -АТФ-синтазы, а также механизма действия олигомицина А на АТФазу разрабатываются методы трансформации гидроксильной группы олигомицина А по С-33-положению боковой цепи в другие функциональные группы: галогены (F, Cl, Br), SCN, SH (рисунок 12).

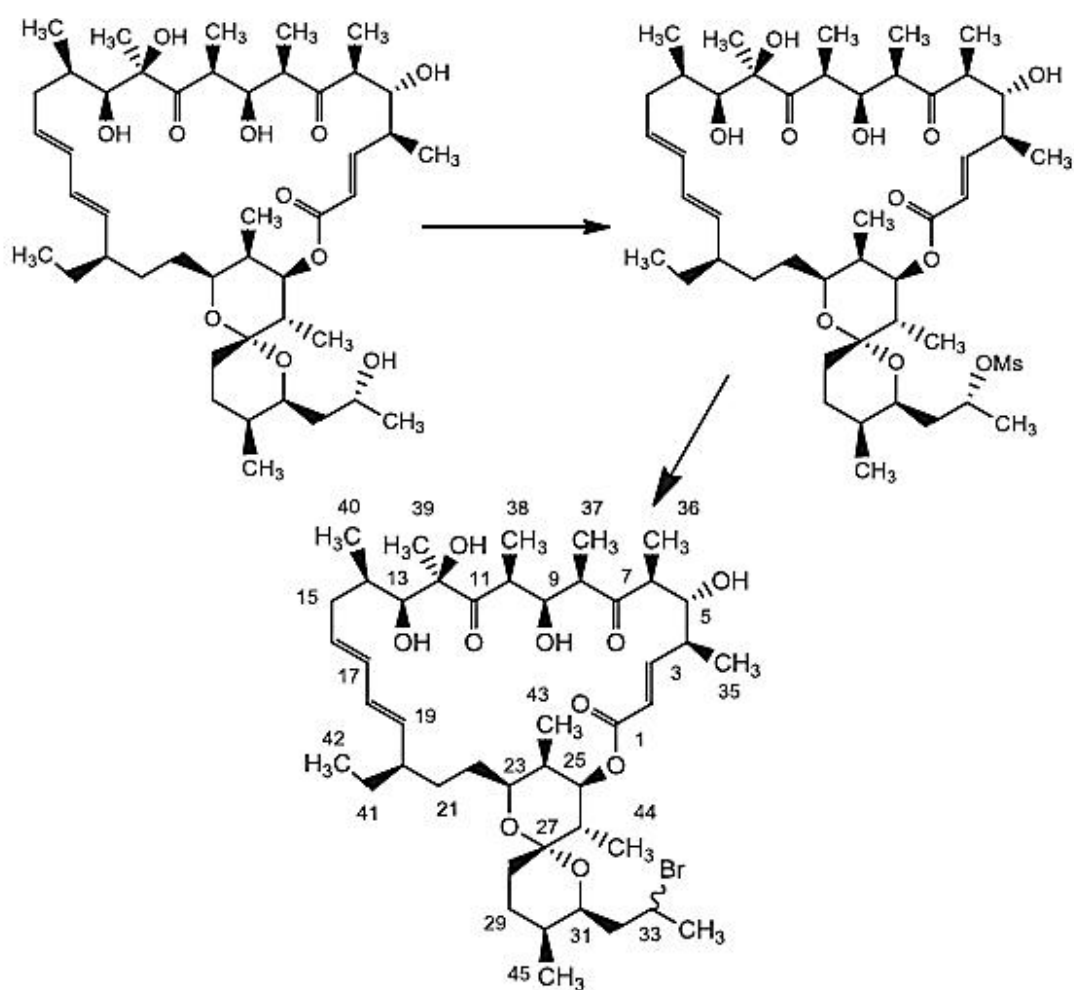


Рисунок 12. Схема синтеза 33-(R,S)-бромо-33-дезоксиолигомицина А (Lysenkova L.N. et al., 2016)

На основании исследований актиномикозных свойств 33-(R,S)-бромо-33-дезоксиолигомицина А, показано, что замещение 33-гидроксигруппы на атом брома в боковой цепи олигомицина А приводит к значительному снижению активности в отношении тест-культур *S. fradiae* и *S. albus*. Эти эксперименты позволили сделать вывод о важности 33-гидроксильной группа в механизме действия олигомицина А (Lysenkova L.N. et al., 2016).

Был разработан метод химической модификации макролидного антибиотика олигомицина А по 33 положению боковой цепи. В результате селективного мезилирования получен 33-О-мезилолигомицин, который трансформирован в 33-азидо-33-дезоксиолигомицин А (рисунок 13).

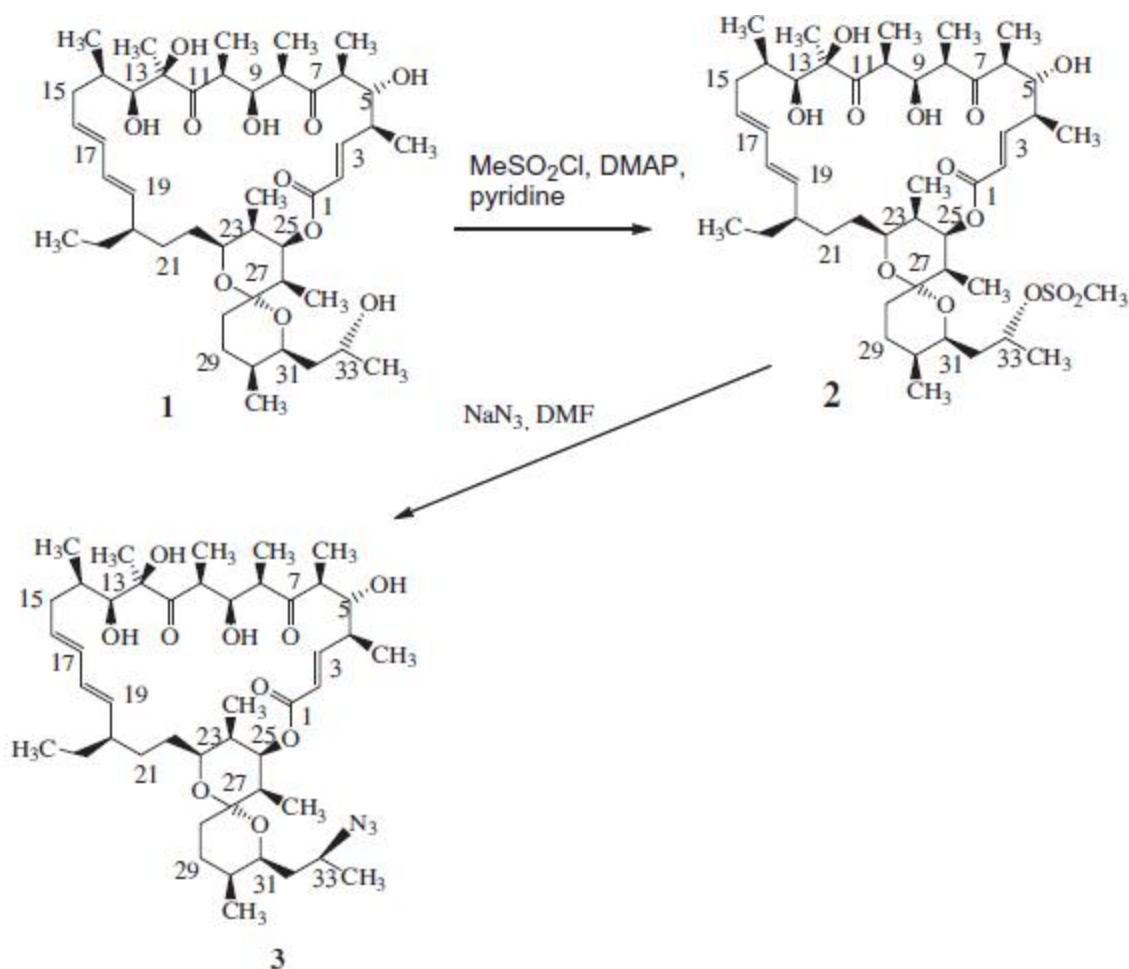


Рисунок 13. Схема синтеза 33-О-мезилолигомицина (2) и (33S)-азид-33-дезоксиолигомицин (3) из олигомицина А (1) (Lysenkova L.N. et al., 2013).

Синтезированные производные были значительно менее активными, чем олигомицин А в отношении F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609. (33S)-азид-33-дезоксиолигомицин аналогично цитотоксичен для клеточных линий карциномы толстой кишки человека К562 и НСТ116, как и олигомицин А. Важно отметить, что цитотоксичность для незлокачественных фибробластов кожи была значительно менее выраженной. Полученные данные предоставляют ценную информацию для разработки новых лекарственных средств (Lysenkova L.N. et al., 2013).

1.3.2 Грамположительные бактерии, чувствительные к олигомицину А

Большинство бактерий устойчивы к действию макролидного антибиотика олигомицин А, продуцируемого актиномицетами рода *Streptomyces* (Smith R. M. et al., 1954), исключение составляют представители грамположительных бактерий типа актинобактерии, в том числе и стрептомицеты. Ингибирование F₀F₁-АТФазы олигомицином А приводит к нарушению процессов энергетического обмена, окислительного фосфорилирования (Jonckheere A.I. et al., 2012).

Бактерии и прочие инфекционные организмы проверяются на степень устойчивости к различным антиинфекционным веществам. Активность отдельных препаратов против изолированного организма классифицируется одним из трех терминов «восприимчивый» (более ранний термин: «чувствительный»), «промежуточный», «устойчивый/резистентный». Полученные данные важны при анализе степени резистентности к лекарственным средствам и являются важным критерием отбора антибиотиков для первоначального («эмпирического») лечения инфекционных заболеваний. Активность антибиотиков в отношении тех или иных бактерий *in vitro* определяется минимальной ингибирующей концентрацией (МИК). МИК определяется как минимальная концентрация антибиотика, предотвращающая дальнейшее развитие инфекционного организма *in vitro*. Согласно мировому стандарту ISO 20776-1 термины характеризуются следующим образом (Rodloff A. et al., 2008):

- Чувствительный (Susceptible (s)): рост бактериального штамма ингибируется *in vitro* минимальной концентрацией антибиотика, чем обеспечивается высокая вероятность терапевтического успеха
- Промежуточный/умеренно-чувствительный (Intermediate (i)): рост ингибируется *in vitro* некой концентрацией препарата, но сопровождается неопределенным терапевтическим эффектом.

- Устойчивый/резистентный (Resistant (r)): бактериальный штамм показывает резистентность к исследуемому препарату, что обуславливает невозможность успешного терапевтического лечения.

Антибиотики группы олигомицинов активны против *Aspergillus niger*, *Candida albicans* и *Cryptococcus humicola* (МОБИХим 2015). Олигомицин А и С были зарегистрированы как ингибирующие метаболиты против некоторых основных фитопатогенов, включая *Phytophthora capsici* (*peronosporomycete*), однако они неактивны против дрожжей и бактерий (Kim B. S. et al., 1999; Yang P.W. et al., 2010). Значительный научный интерес представляет тот факт, что олигомицины ингибируют синтез АТФ, влияя на окислительное фосфорилирование в митохондриях (Liu X. et al., 2004).

1.3.3 Механизм действия олигомицина А на F₀F₁-АТФ-синтазу бактерий

Олигомицин А предположительно связывается с а – и с - субъединицами F₀ - сектора АТФ-синтазы, блокируя работу белка OSCP (the oligomycin sensitivity conferring protein). (Jonckheere A.I. et al., 2012). Предположительно, олигомицин А связывается с карбоксильной группой Glu 59, которая участвует в трансмембранном протонном переносе, сопряженным с синтезом АТФ. В АТФ-синтазе олигомицин связывается с с-кольцом, блокируя транслокацию протонов, перекрывая доступ к основному карбоксилу (рисунок 14).

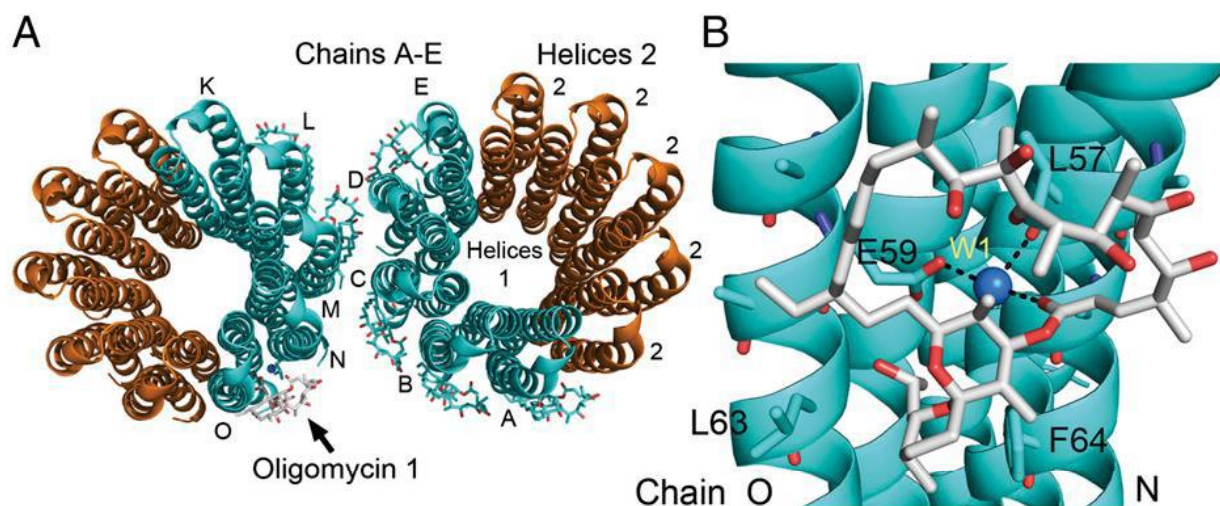


Рисунок 14. Связывания олигомицина и с-кольца (А), олигомицин - связывающий сайт (В) . Спирали, окрашенные в голубой цвет, представляют собой копии в асимметричной единице; спирали, окрашенные в оранжевый цвет, являются симметрично связанными. Молекулы олигомицина показаны только в асимметричной единице. Helix 1 - первая спираль в с-субъединице, упакованная внутри с-кольца. Helix 2 упаковывается с наружной части с-кольца. Субъединицы асимметричной единицы обозначены А-Е и К-О. Олигомицин (структура обозначена серым цветом) связан с цепями О и N. Атомы углерода в олигомицине окрашены в серый, кислорода в красный, азота в синий цвета. Молекула воды (W1) образует мостиковую Н-связь между Glu59 на О цепи, карбониле Leu57 на цепи N и эфирном карбониле олигомицина (O36) (Symersky J. et al., 2012).

Олигомицин связывается с 2 смежными с-субъединицами (рис.14). Гидрофобная часть молекулы олигомицина покрывает гидрофобную грань с-субъединицы, а гидрофильная часть олигомицина преимущественно подвергается воздействию растворителя. Молекула олигомицина покрывает Glu59 и затеняет доступ к карбоксигруппе боковой цепи. Карбоксил боковой цепи Glu59 образует Н-связь с молекулой воды, которая, в свою очередь, образует Н-связь с карбонильным кислородом Leu57 и эфиром карбонильного кислорода (O36) в олигомицине. Через мостик молекулы воды образуется водородная связь между Glu59 и олигомицином. Можно предположить, что олигомицин ингибирует транслокацию протонов в F_0F_1 -АТФ-синтазе путем блокировки эфирного карбоксила в полузамкнутой конформации и защиты его доступа к водной среде протонного полуканала. Оставшиеся взаимодействия между олигомицином и с-

субъединицей происходят главным образом благодаря Ван-дер-Ваальсовым взаимодействиям.

Предположительно, сайт связывания, образованный олигомицином, является типичным сайтом связывания для лекарственных препаратов, воздействующих на бактериальные и митохондриальные с-субъединицы. Анализ кристаллической структуры с-кольца патогенных бактерий обеспечивают основу для создания новых антибиотиков путем проектирования (Symersky J. et al., 2012)

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Штаммы бактерий

В работе использовали штаммы: *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 (геномная ДНК секвенирована в лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН, последовательность генома депонирована в GenBank под номером JNAD000000000) (Bekker O.V. et al., 2014);

E. coli DH5a: F⁻, Φ 80 ΔlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169 (Promega) (Inoue H. et al., 1990);

E. coli BL21(DE3): F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B⁻m_B⁻), gal λ (DE3) (Novagen) (Mierendorf R. et al., 1994).

2.2. Векторы, использованные для клонирования фрагментов ДНК

Для клонированию фрагментов ДНК и экспрессии генов всех субъединиц F₀F₁- АТФ синтазы использовали вектор pET32a («Novagen», США) (Mierendorf R. et al., 1994) (рисунок 15).

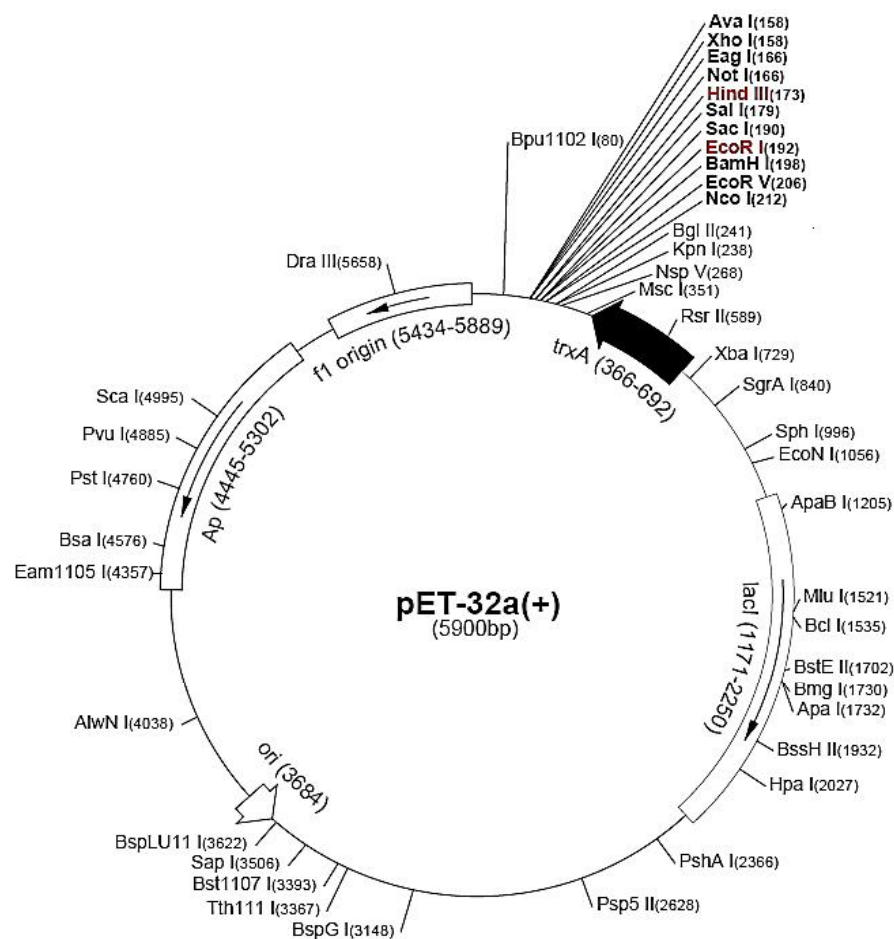


Рисунок 15. Схема экспрессионного вектора pET32a. Сайты клонирования выделены красным цветом.

Экспрессионный вектор pET32a содержит в N- и C-концевых областях полилинкера His-Tag для выделения и очистки белков и ген тиоредоксина в N-концевой области. Тиоредоксин разрывает и восстанавливает дисульфидные связи в белках, т.о. регулируя активность некоторых ферментов, способствует поддержанию правильной третичной структуры.

2.3. Культивирование бактерий

Для выращивания штамма *S. fradiae* ATCC 19609 использовали жидкую среду YEME с 25% сахарозы (*m/V*) (Kieser T. et al., 2000) при 28°C в течение 24 ч (позднелогарифмический рост), мицелий собирали в течение 30 мин центрифугированием при 3000 g и замораживали при -20°C.

Для выращивания клеток *E. coli* использовали среду Лурия (L-бульон). Твердые среды содержали 2,0% агара (*m/V*) (Sambrook J. et al., 1989). Для обеспечения селективного роста плазмидосодержащих клеток добавляли ампициллин в концентрации 150 мкг/мл. Полный состав сред приведен в таблице 1.

Таблица 1. Питательные среды, использованные для выращивания штаммов *E.coli*

Название среды	Состав среды на 1 литр
YEME готовится на водопроводной воде	бакто-пептон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 3 г/л, мальт-экстракт – 3 г/л, глюкоза – 10 г/л, сахароза – 250 г/л; после автоклавирования к 50 мл среды добавляли 0,1 мл 2,5М раствора MgCl ₂ (стерильного)
LB бульон	бакто-триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л, глюкоза – 1 г/л, pH 7.2 - 7.4
SOB	бакто-триптон – 20 г/л, дрожжевой экстракт – 5,5 г/л, NaCl – 2 г/л, KCl – 10 г/л, pH 7.4 (доводится KOH); после автоклавирования к 100 мл среды добавляли 2 мл 1 М MgSO ₄ (стерильного)

Для проверки экспрессии генов всех субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 и наработки биомассы для выделения белков клетки *E.coli* BL21(DE3), содержащие сконструированные плазмиды, выращивали в колбах с жидкой средой LB с добавлением 0,1% глюкозы и ампицилина (150 мкг/мл).

На первом этапе выращивали ночные культуры всех анализируемых вариантов в жидкой среде LB. На втором этапе в колбы со свежей средой вносили

ночную культуру в количестве 1:100, выращивали при 250 об/мин и температуре 37°C в аэрируемых условиях около 2 часов до оптической плотности (OD_{600}) 0,6. Экспрессию индуцировали добавлением ИПТГ до финальной концентрации 1мМ. Культивировали 4-5 часов при 28°C, после биомассу осаждали центрифугированием 15 мин при 6 000 об/мин и замораживали при -20°C.

2.4. Выделение геномной ДНК штамма *S. fradiae* ATCC 19609 (Kieser T. et al., 2000)

Мицелий *S. fradiae* ATCC19609 ресуспендировали в 4 мл ТЕ-буфера (25mM TRIS HCl, 20 mM ЭДТА, pH 8,0), добавляли 250 мкл 10% SDS и 120 мкл протеиназы К, перемешивали стеклянной палочкой и инкубировали в течение 3,5 часов при 55°C, периодически помешивая. К лизату клеток добавляли 4 мл фенола, осторожно перемешивали переворачиванием в течение 1 минуты. Центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин. Супернатант отбирали в чистую пробирку, обработку фенолом повторяли. Супернатант отбирали в чистую пробирку и добавляли 4 мл хлороформа с изоамиловым спиртом (24 хлороформа: 1 изоамилового спирта). Содержимое пробирки перемешивали переворачиванием в течение 1 минуты. Центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин, водную фазу переносили в чистую пробирку. Тотальную ДНК осаждали добавлением к супернатанту 5 мл 96% этанола, перемешивали переворачиванием и инкубировали 40 мин при -70°C с последующим центрифугированием 15 мин при 8000 об/мин. Для промывание осадка использовали 70% этиловый спирт, высушенный осадок растворяли в 500 мкл воды.

2.5. Амплификация ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР с геномной ДНК штамма *S. fradiae* ATCC 19609 проводили с использованием набора РСК-100 («Dialat Ltd.», Россия) на приборах РТС-0150 («MJ Research, Inc.», США) и Терцик ТП4-ПЦР01 («ДНК-технология», Россия).

100 мкл смеси для ПЦР содержали: 10 мкл 10×ПЦР буфера, 10 мкл 2,5mM Σ dNTPs, 4 мкл 50mM $MgCl_2$, 300 нг геномной ДНК и 0,8 мкл Tag-полимеразы. Олигонуклеотиды добавляли в концентрации 20 пмоль на 100 мкл смеси.

Для амплификации фрагментов ДНК были сконструированы олигонуклеотиды, гомологичные N- и C-концевым областям генов α -, σ -, β -, δ -, α -, γ -, β - и ϵ -субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 с использованием программы Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

Температурный режим отжига праймеров рассчитывали по формуле:

$$T_{\text{отжига}} = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2 - 2.$$

ПЦР включала 25 циклов амплификации: денатурацию ДНК при 94°C в течение 1 мин, отжиг олигонуклеотидов при 56°C в течение 1 мин и достройку ДНК при 72°C в течение 1-2 мин.

Синтез олигонуклеотидов проводили в компании «Синтол». Все используемые в работе олигонуклеотиды представлены в таблице 2.

Таблица 2. Олигонуклеотиды, используемые в работе.

Название олигонуклеотида	Структура олигонуклеотида (5'-3')*	Рестриктаза
Олигонуклеотиды для определения последовательностей генов субъединиц		
АТРВС	GGCCAGCTCGTCGGCGAGC	—
АТРIN	ATGCCGTCCAATGACGTCCG	—
АТРIC	CTCCTTCAGCGTGGCGCATG	—
Del(+)	CGGCAGCGCGAGGAGATCAT	—
Del(-)	GACCTCCTCGCGGAGGCCG	—
Alp(+)	TAGCCTGGAGTCGGGACTC	—
Alp(-)	GTGACGGATCGGATGCGACG	—
Gam(+)	GCACCACCGCAAGATGGAC	—
Gam(-)	GGAGATGGTGCGGACCAGGC	—
Beta(+)	AATCAGCGAGATCGTCGGTGCC	—
Beta(-)	GACGTGCAGCTCAGCAGCCA	—
Eps(+)	GGCGTTCTTCATGTGCGGTGGC	—
Eps(-)	CCGCACACAGTCAGAGCGAG	—
АТРВС	GGCCAGCTCGTCGGCGAGC	—
АТРIN	ATGCCGTCCAATGACGTCCG	—
АТРIC	CTCCTTCAGCGTGGCGCATG	—
Олигонуклеотиды для клонирования генов субъединиц F₀F₁ АТФ-синтазы в <i>E. coli</i>		
АТРAN	ATCCGAATTTCGTGAGTGCTGACCCGACAACG	<i>EcoRI</i>

ATPAC	CCGCAAGCTTGTGGTGTCTCTGCGAGAGCG	<i>Hind</i> III
ATPCN	ATCCGAATTCATGTCCCAGACCCTTGCTGC	<i>Eco</i> RI
ATPCC	CCGCAAGCTTACGAACGGCATGACGAGGCC	<i>Hind</i> III
ATPBN	ATCCGAATTCGTGAACGTTCTGGTTCACCT	<i>Eco</i> RI
ATPBC	CCGCAAGCTTGTCGGCCGGCCTCGGCCTTC	<i>Hind</i> III
DelN	ATCCGAATTCATGAACGGAGCGAGCCGCG	<i>Eco</i> RI
DelC	CCGCAAGCTTGCCGGCCATCCGCCGGGA	<i>Hind</i> III
AlpN	ATCCGAATTCATGGCGGAGCTCACGATCCG	<i>Eco</i> RI
AlpC	CCGCAAGCTTCTTGCCGGCGGCCGGAACGT	<i>Hind</i> III
GamN	ATCCGAATTCATGGGTGCCAGATCCGGGT	<i>Eco</i> RI
GamC	CCGCAAGCTTCCTGTCACTCCCCGCGGTCG	<i>Hind</i> III
BetaN	ATCCGAATTCATGACCACCACTGTTGAGCCG	<i>Eco</i> RI
BetaC	CCGCAAGCTTCAGAATAACGGGCGTGGATCC	<i>Hind</i> III
EpsN	ATCCGAATTCCTGGCTGCTGAGCTGCACGT	<i>Eco</i> RI
EpsC	CCGCAAGCTTGCGCTTGCTCGCGGCCGCG	<i>Hind</i> III
S.Tag	CGAACGCCAGCACATGGACAG	—
T7term	CTAGTTATTGCTCAGCGG	—

*Жирным шрифтом выделены сайты узнавания рестриктаз *Eco*RI (GAATTC) и *Hind*III (AAGCTT).

**S.tag, T7term – стандартные праймеры.

Для проверки результатов амплификации проводили электрофорез в 1% агарозном геле при напряжении 120-140 В в течение 20-40 мин. Размер амплифицированных фрагментов определяли с использованием маркера λ DNA/*Eco*RI+*Hind*III («Fermentas», Литва).

2.6. Выделение фрагментов ДНК из геля

Фрагменты ДНК выделяли из геля с использованием набора Gel Extraction Kit, согласно протоколу «Fermentas», Литва. Проводили электрофорез амплифицированного фрагмента в 1% агарозном геле при напряжении 120-140 В в течение 40 мин. В качестве контроля размера фрагмента использовали маркер λ DNA/*Eco*RI+*Hind*III («Fermentas»). Затем вырезали кусочек геля, содержащий целевой фрагмент, и помещали в эппендорф на 1,5 мл. Добавляли 3 объема Binding Buffer, перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при 50-60°C до полного расплавления геля, центрифугировали в колонке 1 мин при 12 000 об/мин. Колонки дважды промывали 0,7 мл Wash Buffer, далее центрифугировали 1 мин. Остаток Wash Buffer в колонке удаляли центрифугированием 1 мин. В колонках в

1,5мл пробирках элюировали фрагменты ДНК добавлением 30-50 мкл H₂O с центрифугированием 2 мин при 12 000 об/мин.

Количество выделенного фрагмента определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

2.7. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* методом щелочного лизиса (Sambrook J. et al., 1989)

На первом этапе выращивали ночные культуры в жидкой среде LB. Затем биомассу из 3 мл культуры центрифугировали 2 мин при 12 000 об/мин в пробирках по 1,5 мл. Клетки ресуспендировали в 150 мкл раствора I. Добавляли 300 мкл раствора II, осторожно перемешивали и помещали в ледяную баню на 5 мин. Добавляли 300 мкл 3М раствора ацетата калия (pH 4,8), осторожно перемешивали и инкубировали 30 мин в ледяной бане. Центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин. К перенесенному в чистые пробирки супернатанту добавляли 0,5 объема фенола и 0,5 объема хлороформа, осторожно перемешивали. Центрифугировали 5 мин при 12 000 об/мин, водную фазу отбирали в чистый эппендорф. Плазмидную ДНК осаждали добавлением к супернатанту 1/10 V 3М ацетата калия и 2,5 объема 96% этанола, перемешивали и инкубировали 40 мин при -70°C, далее центрифугировали 15 мин при 12 000 об/мин. Осадок промывали 500 мкл 70% этанолом с последующим центрифугированием в течение 5 мин, высушивали и растворяли в 40 мкл воды.

Раствор I: 50 mM глюкозы, 25 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM ЭДТА.

Хранить в холодильнике.

Раствор II: 0,2N NaOH, 1% SDS. Свежеприготовленный.

2.8. Выделение плазмидной ДНК с использованием набора Plasmid Miniprep Kit

Выделение плазмидной ДНК проводили по протоколу набора («Fermentas», Литва). Биомассу из 4,5 мл культуры, предварительно выращиваемой в течение 18

часов, собирали центрифугированием в течение 2 мин при 12 000 об/мин (трижды) в пробирки по 1,5 мл. Клетки ресуспендировали в 250 мкл Resuspension solution (содержащего РНКазу). Добавляли 250 мкл раствора Lysis solution и аккуратно перемешивали, переворачивая эппендорф в течение 2-3 мин. Добавляли 350 мкл раствора Neutralization solution и аккуратно перемешивали переворачиванием пробирок 2-3 мин. Центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Перенесенный в колонку супернатант центрифугировали 1 мин при 12 000 об/мин. Колонки дважды промывали 0,5 мл Wash solution и центрифугировали 1 мин. В колонках, перенесенных в 1,5мл пробирки, элюировали ДНК добавлением 50 мкл бидистиллированной воды, центрифугировали 2 мин при 12 000 об/мин.

2.9. Клонирование субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы

Клонирование проводилось в экспрессионный вектор рЕТ32а по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII*.

2.9.1. Рестрикция

Состав реакционной смеси для рестрикции: плазмидный вектор или фрагмент ДНК (3-5 мкг), буфер (1:10 объема), эндонуклеазы рестрикции (10 единиц фермента на 1 мкг ДНК). Реакцию проводили в течение 1-1,5 часов при температуре 37°C, затем осаждали ДНК добавлением 1:10 объема ацетата калия и 2,5 объема этилового спирта, после чего проводили электрофорез в агарозном геле для контроля концентрации.

2.9.2. Лигирование

Лигирование вектора и клонируемого фрагмента ДНК по полученным в результате рестрикции липким концам проводили с помощью фермента T4 ДНК-лигазы. В реакционной смеси соотношение вектора и клонируемого фрагмента равнялось 1:10 в расчете на количество молекул (учитывался размер вектора и вставки). Состав реакционной смеси для лигирования: плазмидный вектор (0,2-0,4

мкг), фрагмент (0,4-0,8 мкг), лигазный буфер (1:10 объема), T4 ДНК лигаза (30 ед). Реакция проводилась при температуре 12°C в течение 18 часов.

2.10. Трансформация

2.10.1. Получение компетентных клеток *E.coli* для химической трансформации

Проводили моноклоновый рассев штаммов *E.coli* на чашке Петри с агаризованной средой LB. Затем единичные колонии в асептических условиях инокулировали в качалочную колбу вместимостью 50 мл, содержащую 10 мл стерильной питательной среды LB с глюкозой. Инкубировали в термостатированном шейкере (качалке) в течение 18 часов при 37°C и 250 об/мин. Затем клетки засеивали (из расчета 1:100) в качалочную колбу на 750 мл, содержащую 100 мл среды SOB до оптической плотности $OD_{600} = 0.05$. Инкубировали при 37°C и 200 - 250 об/мин в течение двух часов в шейкере до достижения $OD_{600} = 0,6 - 0,8$, охлаждали в ледяной бане 10 мин. Центрифугировали 10 минут при 6000 об/мин и температуре +4°C. Осадок ресуспендировали в 25 мл ледяного раствора Rf 1. Центрифугировали 10 минут при 6000. Далее осадок был ресуспендирован в 10 мл ледяного раствора Rf 2. Суспензию замораживали и хранили при -70°C.

Таблица 3. Состав растворов для получения компетентных клеток (Rf 1 и Rf 2).

Название	Состав (на 200 мл)
Rf 1	137,8 мл H ₂ O, 24 мл глицерина, 20 мл KCl 1M, 10 мл MnCl ₂ , 6 мл CH ₃ COOK 1M, 2,22 мл CaCl ₂ (10% стерильного из ампул), 30 мкл концентрированный HCl (для доведения pH до 5,8)
Rf 2	147,4 мл H ₂ O, 24 мл глицерина, 16,7 мл CaCl ₂ (10% стерильного из ампул), 10 мл MOPS 0,2 M, 2 мл KCl 1M, 300 мкл 2N KOH (для доведения pH до 6,5–6,8)

Для проверки pH стерильно отбирали около 5 мл раствора в маленькую пробирку. Приготовленные растворы проверяли на стерильность (высев шпателем по 200 мкл на агаризованную среду LB).

2.10.2. Трансформация клеток *E.coli* плазмидной ДНК или лигазной смесью

Компетентные клетки размораживали в ледяной бане и затем добавляли плазмидную ДНК в концентрации 0,2 – 0,3 мкг (или лигазную смесь) и инкубировали 40 мин. в ледяной бане. Далее клетки подвергали тепловому шоку 2 - 3 мин. при 42°C. Смесью охлаждали во льду 5 мин, добавляли 1 мл среды LB к клеточной суспензии. Клетки инкубировали при 37°C 40-60 мин (1-2 генерации в термостате). Суспензию высевали на чашки с твердой агаризованной средой LB, содержащей ампициллин (150 мкг/мл).

2.11. Определение нуклеотидной последовательности отобранных клонов (сиквенс)

Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера (Sanger F. et al., 1992) в Научно-исследовательском институте физико-химической медицины. С использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) проводили сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей.

2.12. Анализ экспрессии генов F₀F₁-АТФ-синтазы в системе *E.coli*/BL21(DE3)

Для проверки экспрессии белков клетки *E.coli* BL21(DE3), содержащие сконструированные плазмиды, выращивали в колбах на среде LB с индукцией ИПТГ (см. п.2.3).

Для изучения экспрессии клетки суспендировали в Sample буфере следующего состава: 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% глицерин, 2% 2-меркаптоэтанол, 0.1% SDS, 0.001% бромфеноловый синий, затем клетки разрушали прогреванием при 95°C в течение 10 мин и анализировали с помощью

SDS-электрофореза в 12.5% ПААГ по методу Лэммли. В качестве контроля использовали фракции белков штаммов *E. coli*, содержащих плазмиду pET16b без вставки.

В качестве контроля размера анализируемых белков использовали окрашенный маркер молекулярной массы белков SM0441 («Fermentas»), который представляет собой смесь из 6 очищенных, окрашенных белков с молекулярными массами 19, 26, 34, 50, 90 и 118 кДа. Электрофорез проводили в формирующем геле при напряжении 80В, в разделяющем геле при 150В. По окончании электрофореза гель помещали на 30 мин в фиксирующий раствор. Окрашивание геля проводили при нагревании до 88-90°C. Гель отмывали от красителя 7% уксусной кислотой при нагревании.

Основные растворы:

1. Раствор А рН 8,8 (доводят HCl): 1,5 М Трис-base; 0,1% SDS
2. Раствор А' рН 6,8 (доводят HCl): 0,5М Трис-base, 0,1% SDS
3. Раствор В (акриламид 30%): 29,2% акриламид; 0,8% метилен-бисакриламида
4. Sample буфер (для лизиса клеток): 1М Трис-HCl; 5% глицерин, 2% меркаптоэтанол, рН доводят HCl до 6.8; + 4% SDS, бромфеноловый синий
5. Лизирующий буфер с PMSF: 50mM KH_2PO_4 рН 7.2; 1М NaCl, 100mM PMSF; 0,5М ЭДТА
6. Электродный буфер, рН 8.3-8.4: 0,025М Трис-base; 0,192М глицина, 0,1% SDS.
7. Состав 12%-го разделяющего геля (на 1 стекло): 5 мл раствора А, 8.3 мл раствора В, 1 мл глицерина, 5.7 мл H_2O , 150 мкл 10% PSA, 35 мкл TEMED;
8. Состав 5%-го концентрирующего геля (на 1 стекло): 1.5 мл раствора А', 1 мл раствора В, 3.5 мл H_2O , 80 мкл 10% PSA, 15 мкл TEMED;

9. Фиксирующий раствор: 150 мл этанола, 40 мл ледяной уксусной кислоты, 110 мл воды.

10. Раствор для окрашивания геля: 0,4 г кумаси G-250, 80 мл 96% спирта, 40 мл уксусной кислоты, 180 мл H₂O;

11. Отмывка геля - 7% уксусная кислота.

2.13. Двумерный гель-электрофорез (SDS-PAGE)

Проводили по методике О'Фарелла (O'Farrell P.H. 1975) с небольшими модификациями.

2.13.1 Состав растворов для проведения двумерного электрофореза белков

- 1) 2М Трис-НСl pH 6,8 и pH 8,8
- 2) SDS sample-буфер 100 мл: 0,0635М ТРИС pH=6,8; 2,3% SDS; 5% β-меркаптоэтанол; 10% глицерин.
- 3) 30% раствор акриламида для IEF (1-е направление):
28,38 г акриламида; 1,62 г бисакриламида; 70 мл бидистиллированной воды
- 4) 30% раствор акриламида для SDS фореца (2-е направление):
29,2 г акриламид; 0,8 г бисакриламид; 70 мл бидистиллированной воды
- 5) Смесь для полимеризации(5 мл): 8,5 М мочевины; 4% акриламид (из 30%); 2,2% смесь амфолитов (1/4 pH 3,0-10,0/ 3/4 pH 5,0-7,0); 10% p-p глицерина; 2% CHAPS
- 6) Раствор для анода (2,5 л): 0,01 М H₃PO₄
- 7) Раствор для катода (0,5 л): 10 Н NaOH
- 8) Рабочий гель: Акриламид 12,5%; Трис-НСl 0,375М pH=8,8; SDS 0,1%
- 9) Формирующий гель: Акриламид 4,75%; Трис-НСl 0,125М pH=6,8; SDS 0,1%
- 10) ТРИС-глициновый буфер (1л), pH 8.8: 0,025М Трис-base; 0,192 М глицин; 0,1% SDS
- 11) ТРИС 0,375М pH=8,8; SDS 0,1%
- 12) Лизирующий буфер по О'Фарелу (5 мл): 8М мочевины; 2% CHAPS;

50 mM DTT; 2,2% смесь амфолитов ($\frac{1}{4}$ pH 3,0-10,0 / $\frac{3}{4}$ pH 5,0-7,0); 1mM PMSF.

2.13.2 Приготовление посуды

Стеклянные трубочки для первого направления и пастеровские пипетки заливали хромпиком на 1 час для стерилизации. Стекла для камеры заливали хромпиком и оставляли на 15 мин. Все промывали дистиллированной водой, высушивали. Чистые трубочки заливали 1% раствором силиконового масла и тетрахлорметана. Масло сливали, трубочки стерилизовали в автоклаве при 160°C в течение 1,5 часа. Пастеровские пипетки без заливки высушивали в шкафу, камеры промывали дистиллированной водой.

2.13.3 Электрофорез белков в первом направлении

Трубочки устанавливали на штатив, обматывая края пленкой Parafilm. С помощью шприца и пастеровские пипетки быстро вносили смесь для полимеризации (перед внесением добавляли в нее 10% PSA и TEMED), избегая образования пузырей. Сверху наслаивали инициатор полимеризации (смесь TEMED+PSA и H₂O 1:1). Оставляли застывать на 30 мин. Сливали инициатор полимеризации, вносили 50 мкл лизирующего буфера, оставляли застывать. Снимали пленку Parafilm с трубочек. В нижнюю часть камеры заливали раствор для анода, в верхнюю – для катода (чтобы торцы трубочек чуть закрывались).

Проводили префокусировку: 90 В – 15 мин, 125 В – 25 мин, 170 В – 25 мин. Наносили пробы и маркер, сверху наслаивали смесь лизирующего буфера и H₂O.

Собирали установку, заливали буферы для катода и анода и проводили электрофорез при 225 В в течение 14 часов.

2.13.4 Электрофорез белков во втором направлении

Проводился так же, как электрофорез в ПААГ, описанный в п. 2.12.

2.14. Выделение и очистка белков методом металлоаффинной хроматографии

Проводили с помощью набора Ni-NTA Fast Start Kit («Qiagen»).

1. Клетки, собранные центрифугированием (из 150 мл культуры), ресуспендировали в 20 мл лизирующего буфера, содержащего: 50 мМ NaH_2PO_4 , 5 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, pH - 8,0), раствор лизоцима (20 мг/200 мкл), 20 мМ β -меркаптоэтанола.
2. Лизис проводили 1 часа в ледяной бане (суспензию перемешивали 2-3 раза).
3. Обработывали в ультразвуковом дезинтеграторе в течение 4 мин (20 сек. pulse, 15 сек. off).
4. Центрифугировали (7500 об/мин, 30 мин, 4°) для разделения на растворимую цитоплазматическую фракцию (лизат) и осадок (тельца включения).
5. Аккуратно ресуспендировали смолу в колонке, перевернув ее несколько раз.
6. Промывали колонку 6 мл лизирующего буфера.
7. Лизат пропускали через колонку.
8. Колонку трижды промывали 4 мл промывочного буфера, содержащего: 50 мМ NaH_2PO_4 , 5 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 50 мМ имидазола, pH - 8,0.
9. Связавшиеся белки элюировали с колонок 1 мл буфера, содержащего: 50 мМ NaH_2PO_4 , 5 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 300 мМ имидазола, pH-8,0.
10. К полученному белку добавляли 20% глицерина и хранили при -70°C .
11. Концентрацию выделенных белков определяли методом Бредфорд.

2.15. Количественный анализ белков методом Бредфорд (Bradford M.M. 1976)

Метод основан на связывании белками красителя Coomassie Brilliant Blue G-250. Механизм связывания Coomassie заключается во взаимодействии анионной формы красителя с белком. В результате связывания цвет красителя из

красновато-коричневого становится голубым. Связывание с белком осуществляется за счет электростатического взаимодействия сульфонильных групп красителя с аминокислотными остатками белка. Связывание красителя Coomassie происходит преимущественно с аргининовым остатком (Arg).

Проведение исследования:

1. Вносили в заранее подписанные пробирки по 500 мкл стандартных разведений БСА или образец с неизвестной концентрацией белка.

2. Вносили в пробирку, подписанную как «0» или «Контроль» 500 мкл дистиллированной воды или того раствора, в котором проводилось измерение образцов.

3. В каждую пробирку добавляли по 500 мкл реагента.

4. Перемешивали содержимое пробирок на вортексе.

5. Инкубировали пробирки 5 мин при комнатной температуре.

6. Измеряли значение поглощения растворов на спектрофотометре при длине волны 595 нм.

7. На основе полученных результатов при измерении стандартных разведений строили калибровочную кривую и с ее помощью рассчитывали концентрацию белка в образце.

Состав реагента «Брэдфорд» (1л):

100 мг кумасси G-250, 50 мл этанола, 100 мл ортофосфорной кислоты, объем довести до 1л водой и профильтровать через бумажный фильтр. Реагент очень чувствителен к белку (1-2 мкг/мл).

Чистый раствор Брэдфорд имеет коричневый цвет и синее при наличии белка.

2.16. Получение суммарного препарата СТПК *S. fradiae* ATCC 19609 (Elizarov S.M. et al., 2000; Elizarov S.M. et al., 2001)

Выделяли из экстрактов бактерии хроматографией на цибакрон-сефарозе.

2.16.1. Получение экстрактов

Мицелий стрептомицетов ресуспендировали в буфере А (50 мМ Tris-HCl, 125 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 5 мМ MgCl₂, 10% глицерин, 1 мМ ФМСФ, 0,5 мМ ДТТ, 150 мМ β-глицерофосфат, 100 мМ NaF, леупептин и пепстатин - по 1 мкг/мл каждого, рН 7,8), а также 1 мг/мл лизоцима. Инкубировали 60 мин при 37°C, после чего разрушали клетки двухкратным озвучиванием. Экстракты инкубировали 5 мин при 4°C в присутствии 25 мкг/мл панкреатической РНКазы, и затем удаляли клеточный дебрис центрифугированием при 20000 x g в течение 30 мин. Добавляли равный объем буфера для приготовления образцов с удвоенной концентрацией всех компонентов, образцы прогревали 10 мин при 95°C и анализировали SDS-PAGE.

2.16.2. Выделение протеинкиназ

Для аффинного выделения СТПК белки экстрактов в буфере В (20 мМ триэтаноламин-HCl, рН 7,8, 200 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂, 3 мМ ДТТ, 0,5 мМ PMSF, 10% глицерин) адсорбировали на голубую Сефарозу CL-6B ("Pharmacia Biotech"), смолу отмывали буфером В и элюировали адсорбированные белки буфером В, содержащим 1,5 М NaCl и 20 мМ АТФ. Фракции элюата объединяли и очищали от соли и АТФ на Сефадексе G-20 и анализировали SDS-PAGE.

2.17. Фосфорилирование субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы

Фосфорилирование субъединиц проводили в буфере А, содержащем 50 мМ Tris-HCl (рН 7,8), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ ФМСФ, 0,01%-ный Tween-20, 10%-ный глицерин.

Перед добавлением в реакционную смесь СТПК прединкубировали 10 мин при 28°C в буфере А в присутствии 2 мМ немеченой АТФ. Вносили по 3 мкг рекомбинантных белков δ -, α -, γ -, β -, ϵ -, α -, σ - или ν -субъединиц и АТР до конечной концентрации 50 мкМ (содержащего 10 Бк/пмоль (γ -³²P)-АТР, ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Конечный объем смеси составлял 30 мкл. Реакцию начинали добавлением 0,5 мкг СТПК, проводили в течение 10 мин при 28°C, и останавливали добавлением 17 мкл буфера для приготовления электрофорезных образцов, реакционную смесь прогревали 5 мин при 95°C. Образцы были проанализированы с помощью SDS-электрофореза в 12.5% ПААГ. Гели фиксировали в 50%-ной ТХУ, окрашивали 0,1%-ным Кумасси R250 и экспонировали с рентгеновской пленкой.

2.18. Получение препаратов мембранных везикул для протеомного анализа

Мицелий *S. fradiae* ATCC 19609 осаждали в течение 10 мин 7800 об/мин при +18°C, после чего производили трехкратную отмывку в 10 объемах 10 мМ Tris-HCl, pH-7,5. Центрифугировали 15 мин 7800 об/мин при +18°C. Полученные осадки растворяли в буфере (10 объемов), содержащем: 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10% глицерин, 1 мМ PMSF, 0,5 мМ DTT, коктейль ингибиторов протеаз («Promega», США), лизоцим 1 мг/мл. Инкубировали при постоянном перемешивании 30 мин +37 оС. Полученные протопласты разрушали озвучивание в УЗД Vibra Cell™ Ultrasonic Processor («Sonic», США): частота 20 кГц трижды по 30 с при 4°C. Клеточные обломки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 4°C и 10 000 g. Отобранный в стерильные пробирки супернатант центрифугировали 10 ч при +4°C и 100 000 g, ресуспендировали в том же буфере (без лизоцима) и повторно центрифугировали 16 ч при 4°C и 150 000 g. Полученные осадки растворяли в шести объемах буфера. Полученные осадки растворяли в шести объемах буфера (без лизоцима). Концентрацию белка определяли методом Бредфорд. Мембранные везикулы замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

2.19. Фосфорилирование белков мембранных везикул

Проводили в течение 10 мин при 25°C в буфере, содержащем: 25 mM Tris-HCl (pH-7,4), 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ЭДТА, 0,1 mM PMSF. Реакцию начинали добавлением АТФ до конечной концентрации 100 мкМ, содержащей 10–20 мкКи (γ -³²P)-АТФ (5000 Ки/мМ (186 ПБк/М), ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН), в присутствии 100 мкг белка везикул. Белки осаждали пятью объемами холодного ацетона, выдерживали 2 ч при –20°C, осадки собирали центрифугированием в течение 20 мин при 4°C и 20 000 g. Подсушенные осадки растворяли в буфере, содержащем 8,5 М мочевины, 2%-ный Тритон X-100, 2,2% амфолиты, 5%-ный β -меркаптоэтанол, нерастворенные агрегаты удаляли центрифугированием, супернатант использовали для дальнейшего разделения методом двумерного гель-электрофореза.

2.20. Подготовка образцов для масс-спектрометрии

Проводили по методике, рекомендованной фирмой «Promega», США (In Gel Digest Protocol), масс-спектрометрический анализ проводился методом, рекомендованным фирмой «Bruker Daltonics» (США) на Bruker Daltonics (UltrafleXtreme Maldi Tof/Tof Ms) («Bruker Daltonics GmbH», Германия) в отделе протеомных исследований НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск производили по базе данных NCBI.

2.21 Получение инвертированных мембранных везикул *S.fradiae* для измерения АТФ-синтазной активности

Мицелий *S.fradiae* ATCC19609 осаждали в течение 10 мин 7800 об/мин при +18°C, после чего производили трехкратную отмывку в 10 объемах раствора, содержащего: 250 mM сахарозу, 10 mM Tris-HCl, pH-7,5, 1mM PMSF. Центрифугировали 15 мин 7800 об/мин при +18°C. Полученные осадки растворяли в буфере (10 объемов), содержащем: 50mM MOPS, 10 mM MgCl₂, 10% глицерин, 1мг/мл лизоцим, 1mM PMSF. Инкубировали при постоянном перемешивании 1 час +37 °C. Полученные протопласты разрушали озвучиванием в УЗД Vibra Cell™ Ultrasonic Processor («Sonic», США): частота 20 кГц трижды (20

сек pulse/ 15 сек off, в ледяной бане). Центрифугировали 20 мин при +4°C и 14000 об/мин. Супернатант отбирали в 1,5 мл пробирки и центрифугировали 1 ч при +4°C и 280 000 g, ресуспендировали в буфере, содержащем: 50 mM MOPS pH-7,5; 10 mM MgCl₂; коктейль ингибиторов протеаз («Roche», Германия) и повторно центрифугировали 1 ч при +4°C и 280 000 g. Полученные осадки растворяли в буфере с добавлением глицерина до 10% (5 объемов). Замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

2.22 Измерение АТФ-синтазной активности в препаратах инвертированных мембранных везикул *S.fradiae* ATCC 19609

Ингибирующее действие производных олигомицина А на F₀F₁-АТФ-синтазу в инвертированных мембранных везикулах *S. fradiae* ATCC19609 определяли по методике Koul A. et al. 2007 с небольшими модификациями. Мембранные везикулы активизировали с помощью NADH, измерение продуцируемой АТФ проводили с использованием люциферин/люциферазной реакции.

Инвертированные мембранные везикулы (конечная концентрация 50 мкг) с добавлением буфера: 50 mM MOPS, pH-7,5, 10mM MgCl₂, прединкубировали с контрольным ингибитором или с олигомицином А 10 мин в шейкере. В качестве положительного контроля использовали N,N-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD, «Alfa Aesar», Вкликобритвния) (Тоёи М. et al., 2013), ингибитор сравнения - Oligomycin А (чистота 95% , получен в АНО «НИЦ «БИОАН», Россия) (Pagliarani A. et al., 2013), отрицательный контроль - Levofloxacin («Sigma», США) (Koul A. et al., 2007). В реакционную смесь вносили NADH до конечной концентрации 2,5 mM и инкубировали в шейкере 1 мин при комнатной температуре. В реакцию добавлением АДФ (конечная концентрация 1 mM) и K₂HPO₄ (конечная концентрация 10 mM). Реакцию останавливали добавлением ледяного раствора, содержащего 2 mM ЭДТА, 1% ТХУ, по истечении 1, 10, 20, 40 и 60 минут. С использованием автоматизированной лабораторной станции Biomek 3000® («Beckman Coulter», США) в 96-луночный планшет вносили 5 мкл смеси, 100 мкл

буфера, содержащего: 100 mM Tris-НОAc, 2 mM ЭДТА, pH-7,75. Затем, 50 мкл люциферазного реагента (ATP bioluminescence Assay Kit HS II, «Sigma», США). Люминесцентный сигнал (RLU- relative light units) - измеряли, используя DTX 880 Multimode Detector («Beckman Coulter», США). Параметры измерения: время – 1000 мс, чувствительность измерения – expected high activity.

2.23. Биоинформатические методы анализа

Последовательности генов субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 и кодируемые ими аминокислотные последовательности были получены из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA244372>).

С использованием баз данных NCBI и UniProt (<http://www.uniprot.org/>) для всех изучаемых генов определяли генетическое окружение, расположение в кластере, межгенное пространство. Поиск промоторов проводили по методу, описанному для *Streptomyces* (Алексеева М.Г. и др., 2009).

Для белков, кодируемых данными генами, определяли доменную структуру и предполагаемую молекулярную функцию. Для выявления потенциальных сайтов фосфорилирования белков использовали программу NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), для вычисления изоэлектрической точки – программу ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Для поиска гомологичных белков у других видов и родов актинобактерий использовали программу BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Поиск гомологичных белков с известной 3D структурой проводили по программе SAS (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/>).

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Биоинформатический анализ F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* АТСС 19609

По литературным данным, ранее была определена нуклеотидная последовательность генов оперона F₀F₁- АТФ-синтазы штамма *Streptomyces lividans* ТК24. Оперон содержит девять генов, *atpIBEFHAGDC*, кодирующих восемь структурных компонентов комплекса АТФ-синтазы и I-белка, полипептида неизвестной функции (Hensel M. et al. 1995).

Для определения нуклеотидных последовательностей генов всех субъединиц F₀F₁- АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609 было сконструировано 16 олигонуклеотидов по фланкирующим областям (95-100% идентичности) геномных ДНК АТФ-синтаз представленных в базе данных NCBI штаммов *S.coelicolor*, *S.lividans* и *S.vermitilis*:

- АТРАН и АТРАС для амплификации субъединицы а;
- АТРСН и АТРСС для амплификации субъединицы с;
- АТРВН и АТРВС для амплификации субъединицы b;
- Del(+) и Del(-) для амплификации субъединицы δ;
- Alp(+) и Alp(-) для амплификации субъединицы α;
- Gam(+) и Gam(-) для амплификации субъединицы γ;
- Beta(+) и Beta(-) для амплификации субъединицы β;
- Eps(+) и Eps(-) для амплификации субъединицы ε.

Изоляцию генов субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы осуществляли с геномной ДНК штамма *S. fradiae* методом ПЦР. Полученные фрагменты секвенированы, определены стартовые кодоны трансляции и терминирующие кодоны для всех субъединиц. Определены нуклеотидные последовательности генов всех

субъединиц и расположение данных генов в кластере F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609. Установлено, что кластер имеет стандартную структуру, гены субъединиц расположены в следующей последовательности: *atpI* (ген, кодирующий регуляторный белок AtpI), далее расположены гены *atpB*, *atpE*, *atpF*, *atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpD*, *atpC*, кодирующие субъединицы α , δ , γ , β и ϵ соответственно (рисунок 16, таблица 4).

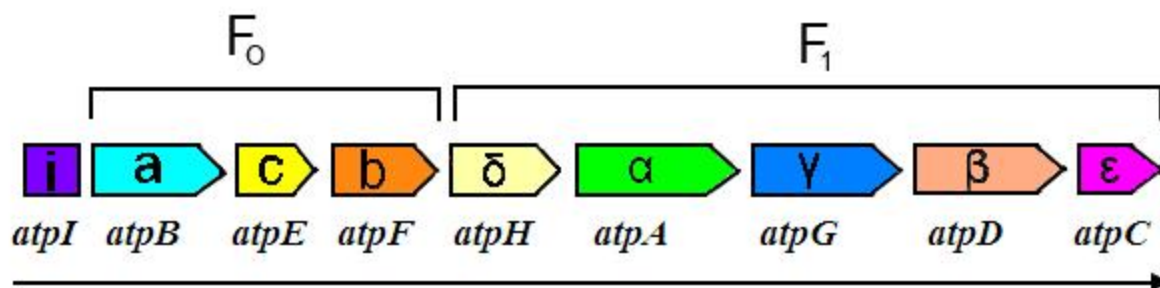


Рисунок 16. АТФ-синтаза штамма *S. fradiae* ATCC 19609 – структура кластера, кодирующего субъединицы.

I-белок, F₀-часть (субъединицы α , δ и β) и F₁-часть (субъединицы δ , α , γ , β , ϵ)

Таблица 4. Характеристика генов субъединиц F₀F₁ АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* и кодируемых ими белков.

Субъединицы АТФ-синтазы <i>S. fradiae</i>	Гены субъединиц		Белки, кодируемые данными генами	
	Название гена	Протяженность, п.н.	Размер белка, а/к	Размер белка, кДа
F ₀ α	<i>atpB</i>	822	273	30,230
F ₀ δ	<i>atpE</i>	225	74	7,411
F ₀ β	<i>atpF</i>	558	185	20,234
F ₁ δ	<i>atpH</i>	816	271	28,944
F ₁ α	<i>atpA</i>	1572	523	56,494
F ₁ γ	<i>atpG</i>	918	305	32,754
F ₁ β	<i>atpD</i>	1455	484	52,477
F ₁ ϵ	<i>atpC</i>	378	125	13,074

В лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН проведено секвенирование геномной ДНК штамма *S. fradiae* ATCC 19609, GenBank

(JNAD00000000.1). Нуклеотидные последовательности всех аннотированных генов АТФ-синтазы ([NCBI PGAP](#)) совпали с ранее секвенированными.

Окружение генов F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609 полностью совпадает с окружениями, характерными для большинства штаммов рода *Streptomyces* (за исключением штамма *S. avermitilis* MA-4680), представленных в базе данных NCBI: со стороны 5'-конца хромосомы расположены гены тирозиновой фосфатазы и трансферазы, за генами АТФ-синтазы расположены ген секретлируемого белка и хитиназы (таблица 5). У штамма *S. avermitilis* MA-4680 со стороны 5'-конца хромосомы расположены гены синтеза олигомицина А – ингибитора F_0F_1 -АТФ-синтазы.

Таблица 5. Локализация генов F_0F_1 -АТФ-синтазы в геноме *S. fradiae* ATCC 19609.

Название гена	Название белка, кодируемого данным геном	Locus_tag (идентификатор в базе данных)	Локализация гена
-	hypothetical protein SFRA_00840	SFRA_00840	198419 - 199066
-	protein tyrosine phosphatase	SFRA_00845	199063 - 199776
-	transferase	SFRA_00850	200207 - 201568
<i>atpI</i>	ATP synthase I	SFRA_00855	201884 - 202321
<i>atpB</i>	ATP synthase F_0F_1 subunit A	SFRA_00860	202586 - 203407
<i>atpE</i>	ATP synthase subunit C	SFRA_00865	203478 - 203702
<i>atpF</i>	ATP synthase F_0F_1 subunit B	SFRA_00870	203744 - 204301
<i>atpH</i>	ATP synthase F_0F_1 subunit delta	SFRA_00875	204298 - 205113
<i>atpA</i>	ATP synthase F_0F_1 subunit alpha	SFRA_00880	205233 - 206804
<i>atpG</i>	ATP synthase F_0F_1 subunit gamma	SFRA_00885	206807 - 207724
<i>atpD</i>	ATP F_0F_1 synthase subunit beta	SFRA_00890	207730 - 209184
<i>atpC</i>	ATP synthase subunit epsilon	SFRA_00895	209317 - 209694

-	hypothetical protein SFRA_00900	SFRA_00900	209820 - 210269
-	chitinase	SFRA_00905	210467 - 211732
-	hypothetical protein SFRA_00910	SFRA_00910	211970 - 212221
-	hypothetical protein SFRA_00915	SFRA_00915	212211 - 213491

Ген *atpB*, кодирующий белок субъединицы а, имеет протяженность 822 п.н. Белок AtpB (номер в GenBank KDS89924, locus_tag "SFRA_00860"), состоит из 273 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 30,230 кДа, изоэлектрическая точка pI=7,00. Доменная структура белка представлена регионом "F₀F₁ ATP synthase subunit A; Validated" (43 - 273 а/к). Потенциальные сайты фосфорилирования - T₄₃, Y₄₅, T₉₇, Y₁₀₆, T₁₅₅.

Ген *atpE*, кодирующий белок субъединицы С, имеет протяженность 225 п.н. Белок AtpE (номер в GenBank KDS89925, locus_tag "SFRA_00865"), состоит из 74 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 7,411 кДа, изоэлектрическая точка pI=4,78. Доменная структура белка представлена регионом "ATP synthase subunit C; c100466" (10 - 74 а/к). Потенциальные сайты фосфорилирования - отсутствуют.

Ген *atpF*, кодирующий белок субъединицы В, имеет протяженность 558 п.н. Белок AtpF (номер в GenBank KDS89926, locus_tag "SFRA_00870"), состоит из 185 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 20,234 кДа, изоэлектрическая точка pI=5,16. Доменная структура белка представлена регионом "ATP-synt_B" (10 - 74 а/к). Потенциальные сайты фосфорилирования - T₆₈, T₁₄₅, S₁₅₅, S₁₆₃, T₁₇₅.

Ген *atpH*, кодирующий белок субъединицы δ (дельта), имеет протяженность 816 п.н. Белок AtpH (номер в GenBank KDS89927, locus_tag "SFRA_00875"), состоит из 271 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 28,944 кДа, изоэлектрическая точка pI=5,54. Доменная структура белка представлена регионом "F₀F₁ ATP synthase subunit delta; Provisional" (1 - 271

а/к). Потенциальные сайты фосфорилирования - T₂₃, S₄₆, S₉₀, S₁₀₄, S₁₃₃, S₁₃₄, S₁₈₂, S₂₁₂, S₂₆₆.

Ген *atpA*, кодирующий белок субъединицы α (альфа), имеет протяженность 1572 п.н. Белок AtpA (номер в GenBank KDS89928, locus_tag "SFRA_00880"), состоит из 523 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 56,494 кДа, изоэлектрическая точка pI=5,12. Доменная структура белка представлена регионами "F₀F₁ ATP synthase subunit alpha; Validated" (4 - 514 а/к), "ATP-synt_ab_N" (30 - 96 а/к), "F₁-ATPase_alpha" (98 - 379 а/к), "ATP-synt_ab_C" (388 - 481 а/к) и содержит сайты "Walker A motif" (173 - 180 а/к), "Walker B motif" (269 - 273 а/к), сайты взаимодействия с субъединицей бета (полипептидное связывание) и АТФ-связывающие сайты (химическое связывание). Потенциальные сайты фосфорилирования - T₅, S₂₈, S₁₄₅, T₁₇₇, S₂₁₅, S₂₁₉, S₃₁₇, S₃₄₈, S₃₉₁, S₄₂₁, S₄₄₁, T₄₅₃, T₄₅₄, T₄₈₅, S₄₈₆, S₅₀₇, S₅₁₅.

Ген *atpG*, кодирующий белок субъединицы γ (гамма), имеет протяженность 918 п.н. Белок AtpG (номер в GenBank KDS89929, locus_tag "SFRA_00885"), состоит из 305 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 32,754 кДа, изоэлектрическая точка pI=6,39. Доменная структура белка представлена регионом "F₀F₁ ATP synthase subunit gamma; Validated" (2 - 297 а/к) и содержит сайты взаимодействия с основными доменами (полипептидное связывание), сайты взаимодействия с субъединицей дельта (полипептидное связывание) и сайты взаимодействия с субъединицей эpsilon (полипептидное связывание). Потенциальные сайты фосфорилирования - S₁₄, T₁₆, T₁₈, S₄₄, T₅₁, S₆₁, T₆₉, T₇₁, T₁₀₂, T₁₂₈, S₁₃₇, S₁₄₄, S₁₄₆, Y₁₄₇, S₁₈₇, S₁₉₇, S₂₀₈, S₂₂₁, S₂₄₈, S₂₅₉.

Ген *atpD*, кодирующий белок субъединицы β (бета), имеет протяженность 1455 п.н. Белок AtpD (номер в GenBank KDS89930, locus_tag "SFRA_00890"), состоит из 484 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 52,477 кДа, изоэлектрическая точка pI=4,79. Доменная структура белка представлена регионами "F₀F₁ ATP synthase subunit beta; Validated" (16 - 482 а/к), "ATP-synt_ab_N" (18 - 92 а/к), "F₁-ATPase_beta" (95 - 368 а/к), "ATP-synt_ab_C"

(376 - 482 а/к) и содержит сайты "Walker A motif" (171 - 177 а/к), "Walker B motif" (260 - 264 а/к), сайты взаимодействия с субъединицей альфа (полипептидное связывание), АТФ-связывающие сайты (химическое связывание) и сайты связывания с ингибитором. Потенциальные сайты фосфорилирования - T₃, T₄, S₇₅, T₉₁, S₁₂₂, T₁₂₅, S₁₄₂, S₃₀₆, S₃₁₁, T₃₃₂, S₃₄₈, S₃₅₃, S₃₇₂, Y₃₇₆, S₄₂₃, Y₄₅₇.

Ген *atpC*, кодирующий белок субъединицы ε (эпсилон), имеет протяженность 378 п.н. Белок AtpC (номер в GenBank KDS89931, locus_tag "SFRA_00895"), состоит из 125 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 13,074 кДа, изоэлектрическая точка pI=5,03. Доменная структура белка представлена регионом "F₀F₁ ATP synthase subunit epsilon; Validated" (2 - 124 а/к), сайты взаимодействия с субъединицей гамма (полипептидное связывание). Потенциальные сайты фосфорилирования - S₁₈, T₂₂, T₂₉, T₆₀, T₉₂, S₁₀₄, S₁₀₆, S₁₂₃. Паспорт кластера генов F₀F₁-АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 и кодируемых ими белков представлен в приложении 1.

Проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков, кодируемых генами субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609, внутри рода *Streptomyces*, а также внутри типа *Actinobacteria* представлен в приложении 2 (таблицы 1-4). Анализ показал, что для всех субъединиц, кроме с-субъединицы ближайшими гомологами являются субъединицы, принадлежащие видам *S. albus* и *S. xinghaiensis*. Для с-субъединицы ближайшими гомологами являются субъединицы, принадлежащие видам *S. ambofaciens*, *S. parvulus* и *S. subbrutilus*. Субъединицы α, β высоко консервативны. Менее консервативными являются δ-, γ-, ε-субъединицы. Так, например, процент идентичности субъединиц α и β у разных представителей актинобактерий, не ниже 54%, тогда как процент идентичности субъединицы γ и ε между разными представителями актинобактерий может быть равен 31%, а субъединицы δ 27%. В F₀-части наиболее консервативными являются с- и b-субъединицы, менее консервативна а-субъединица.

3.2. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609 с ортологами из белковой базы данных

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы из штамма *S. fradiae* ATCC 19609 с субъединицами из штамма *S. lividans* ТК24 (чувствительного к олигомицину А) и штамма *S. avermitilis* МА-4680 – продуцента олигомицина А (устойчивого к олигомицину А), показало, что последовательности субъединиц α, с и γ из штамма ATCC 19609 имеют большее сходство с аналогичными субъединицами из штамма ТК24, остальные субъединицы имеют высокую степень консервативности для всех трех штаммов (таблица 6).

Таблица 6. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 с последовательностями субъединиц АТФ-синтаз *S. lividans* ТК24 и *S. avermitilis* МА-4680.

Субъединицы АТФ-синтазы	Гомология с субъединицами АТФ-синтаз			
	<i>S. lividans</i> ТК24		<i>S. avermitilis</i> МА-4680	
	идентичность	сходство	идентичность	сходство
<i>S. fradiae</i> ATCC 19609				
F ₀ α AtpB	82%	91%	77%	88%
F ₀ с AtpE	96%	98%	85%	90%
F ₀ β AtpF	88%	91%	87%	90%
F ₀ δ AtpH	75%	85%	76%	87%
F ₁ α AtpA	92%	96%	92%	96%
F ₁ γ AtpG	78%	89%	75%	87%
F ₁ β AtpD	88%	94%	88%	93%
F ₁ ε AtpC	84%	92%	85%	92%

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы с последовательностями субъединиц других видов

Streptomyces показал, что для всех субъединиц, кроме с-субъединицы ближайшими гомологами являются виды *S. albus* и *S. xinghaiensis*. Для с-субъединицы ближайшими гомологами являются виды *S. ambofaciens*, *S. parvulus* и *S. subbrutillus*.

Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 является удобным модельным объектом для исследования ингибиторов F₀F₁-АТФ-синтазы бактерий (Алексеева и др. 2009г., Lysenkova L. et al. 2013, Ко Y. H. et al. 2002). Поэтому представляло интерес проверить сходство белков этого кластера с соответствующими белками некоторых патогенных бактерий.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей восьми субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы из штамма *S. fradiae* ATCC 19609 с последовательностями субъединиц других видов *Streptomyces*, анаэробных актинобактерий рода *Bifidobacterium* и патогенных актинобактерий рода *Mycobacterium* представлен в таблице 7.

Таблица 7. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей субъединиц АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 с последовательностями субъединиц АТФ-синтаз *S. lividans* ТК24 и *S. avermitilis* МА-4680.

Субъединицы	Идентичность с АТФ-синтазой <i>S. fradiae</i> ATCC 19609		
	<i>Streptomyces</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>
F ₀ a AtpB	77-96%	28-34%	27-35%
F ₀ b AtpF	83-99%	35-40%	28-46%
F ₀ c AtpE	85-100%	49-62%	32-58%
F ₁ α AtpA	89-99%	72-74%	71-75%
F ₁ β AtpD	86-99%	72-74%	70-74%
F ₁ γ AtpG	77-99%	44-47%	40-47%
F ₁ δ AtpH	76-98%	31-34%	38-48%
F ₁ ε AtpC	72-98%	37-44%	40-48%

3.3. Получение рекомбинантных белков субъединиц F₀F₁-АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609

С этой целью проводили клонирование генов всех субъединиц в *E.coli*. Изоляцию генов 8 субъединиц осуществляли с геномной ДНК штамма *S. fradiae* ATCC 19609 методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов, гомологичных N- и С- концевым областям генов и содержащих сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII*:

- АТРAN и АТРАС для клонирования субъединицы а;
- АТРСN и АТРСС для клонирования субъединицы с;
- АТРВN и АТРВС для клонирования субъединицы в;
- DelN и DelC для клонирования субъединицы δ;
- AlpN и AlpC для клонирования субъединицы α;
- GamN и GamC для клонирования субъединицы γ;
- BetaN и BetaC для клонирования субъединицы β;
- EpsN и EpsC для клонирования субъединицы ε.

Для клонирования был выбран экспрессионный вектор рЕТ32а. Линкер рЕТ32а содержит His-Tag и S-tag для выделения и очистки белков с помощью аффинной хроматографии и последовательность тиоредоксина Trx•Tag (109 аминокислот) в N-концевой области. Данная генетическая конструкция обеспечивает высокий уровень синтеза и растворимость целевого белка, способствует правильному формированию его структуры, что значительно облегчает процедуру очистки белков в растворимой форме.

Кроме того, гены *atpE* и *atpC*, кодирующие белки субъединиц с и ε, имеют протяженность 225 и 378 п.н., расчетная молекулярная масса данных белков составляет 7,411 и 13,074 кДа соответственно. Данные гены при клонировании в плазмиды, не содержащие ген тиоредоксина, не экспрессировались в *E. coli*.

Полученные фрагменты ДНК клонированы по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII* в экспрессионный вектор рЕТ32а. В результате клонирования генов а-, с-, в-, δ-, α-, γ-, β- и ε- субъединиц получены гибридные

плазмиды pET32a:*atpH*, pET32a:*atpA*, pET32a:*atpG*, pET32a:*atpD*, pET32a:*atpC*, pET32a:*atpB*, pET32a:*atpE* и pET32a:*atpF* (рисунок 17).

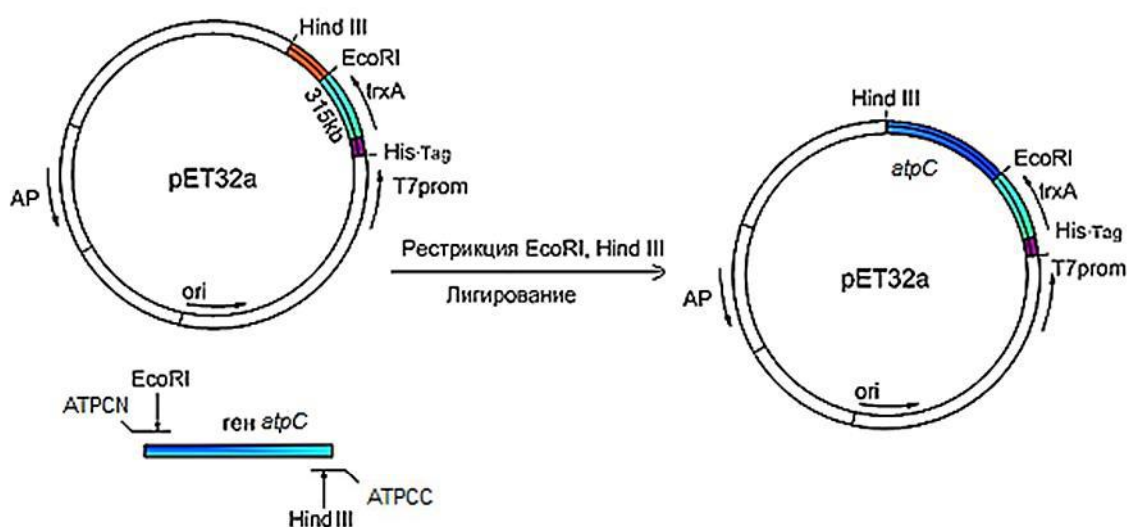


Рисунок 17. Схема клонирования генов с-субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазы в *E.coli*.

Для изучения экспрессии генов 8 субъединиц в *E. coli* штамм BL21(DE3) трансформировали полученными гибридными плазмидами.

Для проверки экспрессии гена с-субъединицы штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий плазмиду pET32a:*atpE*, выращивали в жидкой среде LB с индукцией ИПТГ в течение 1, 2 и 4 ч. В качестве контроля анализировали растворимую фракцию белков штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a без вставки. При клонировании гена с-субъединицы в клетках *E. coli* BL21(DE3) наблюдалась дополнительная фракция белка с молекулярной массой 30 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка субъединицы с в сумме с молекулярной массой белка всего линкера плазмиды pET32a, содержащей тиоредоксин. Установлено, что максимальный уровень экспрессии был достигнут при индукции ИПТГ в течение 4 ч (рисунок 18).

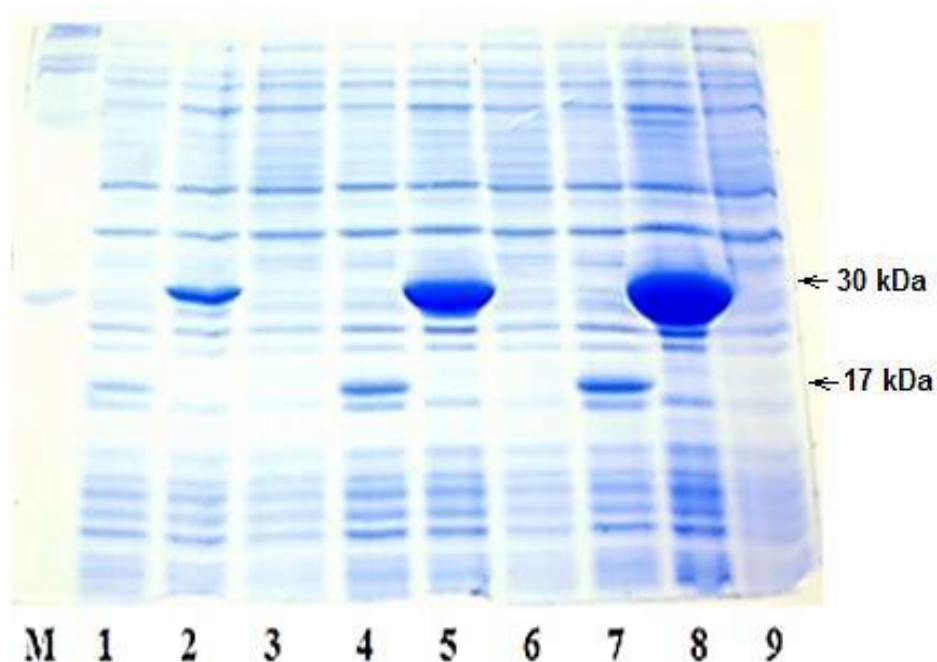


Рисунок 18. Электрофореграмма растворимой фракции белков штамма *E.coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a с с-субъединицей. М – белковый маркер; 1,2,3 - индукция ИПТГ в течение 1 ч; 4,5,6 - индукция ИПТГ в течение 2 ч; 7,8,9 - индукция ИПТГ в течение 4 ч. 1, 4, 7 – плаزمида pET32a; 2, 5, 8 - плазмида pET32a:*atpE* (с- субъединица); 3, 6, 9 - плазмида pET32a:*atpE* (с- субъединица - проба до индукции ИПТГ)

Для изучения экспрессии генов остальных субъединиц штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий плазмиды pET32a:*atpH*, pET32a:*atpA*, pET32a:*atpG*, pET32a:*atpD*, pET32a:*atpC*, pET32a:*atpB* и pET32a:*atpF*, выращивали в жидкой среде LB с индукцией ИПТГ в течение 4 ч. При клонировании δ -, α -, γ -, β -, ϵ -, α - и ν -субъединиц в клетках *E. coli*, содержащих плазмиды с клонированными генами, наблюдались дополнительные фракции белков с соответствующими молекулярными массами 51, 80, 56, 75, 36, 53 и 43 кДа (рисунок 19). Эти величины соответствуют расчетным молекулярным массам белков соответствующих субъединиц в сумме с молекулярной массой белка всего линкера плазмиды pET32a, содержащей тиоредоксин.

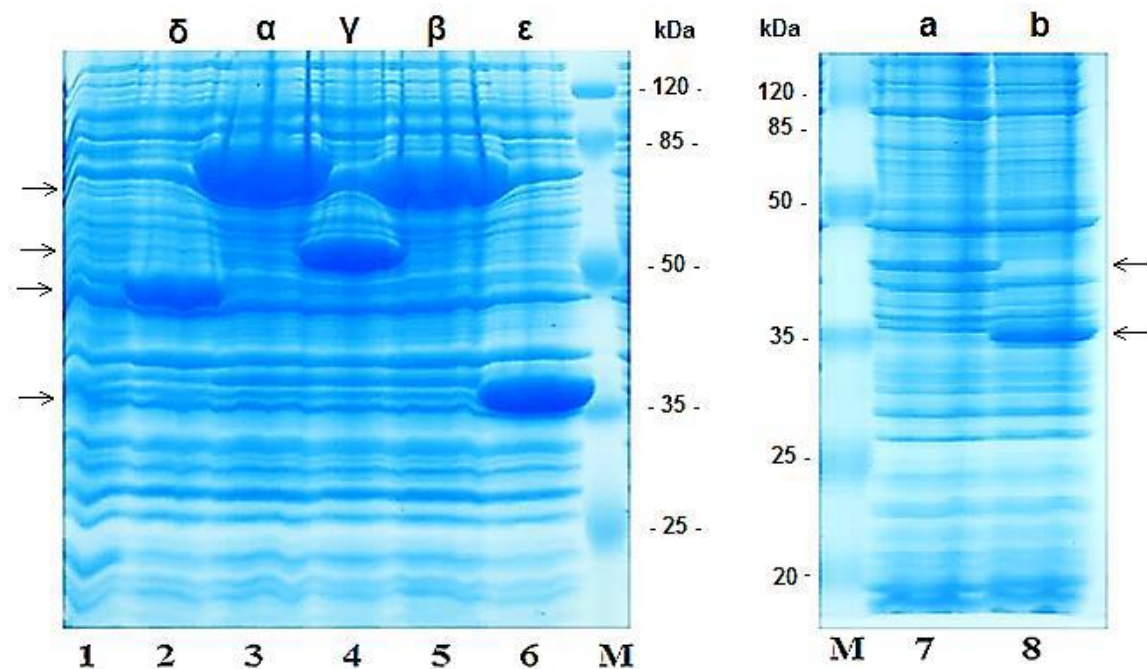


Рисунок 19. Электрофореграмма растворимой фракции белков штамма *E.coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду рЕТ32а с α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, а- и b-субъединицами: 1–рЕТ32а; 2 - рЕТ32а:*atpH* (δ -субъединица); 3 - рЕТ32а:*atpA* (α -субъединица); 4 - рЕТ32а:*atpG* (γ -субъединица); 5 – рЕТ32а:*atpD* (β -субъединица); 6 - рЕТ32а:*atpC* (ϵ -субъединица «эпсилон»); М – белковый маркер; 7 – рЕТ32а:*atpB* (а-субъединица); 8 – рЕТ32а:*atpF* (b-субъединица).

Уровень синтеза целевых белков δ -, α -, γ -, β -и ϵ - субъединиц составлял 40–50% от общего клеточного белка, что увеличивает выход целевых белков. Биомассу, полученную из 150 мл культуры, осаждали центрифугированием, замораживали при -20°C и затем использовали для выделения белков.

Для последующего изучения их фосфорилирования рекомбинантные белки всех 8 субъединиц, клонированных в *E. coli*, выделены в нативных условиях хроматографией на His-связывающих Ni-NTA колонках («Qiagen», Германия) согласно протоколу QIAexpress в препаративных количествах.

3.4. Фосфорилирование рекомбинантных субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 суммарным препаратом СТПК *in vitro*

Для доказательства участия СТПК в модификации белков F_0F_1 - АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 проведен анализ фосфорилирования полученных рекомбинантных белков всех субъединиц.

Рекомбинантные белки всех 8 субъединиц, клонированных в *E. coli*, выделяли в нативных условиях хроматографией на His-связывающих Ni-NTA колонках («Qiagen», Германия) согласно протоколу QIAexpress. Клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие рекомбинантные плазмиды (осадок из 150 мл культуры), размораживали при 4°C и ресуспендировали в 20 мл лизирующего буфера: 50 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ Трис-HCl, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, pH-8,0, лизоцим (20 мг/200 мкл) и 20 мМ β-меркаптоэтанола, инкубировали 1 час при 4°C. Затем озвучивали в УЗД в течение 4 мин (в ледяной бане), и центрифугировали для отделения лизата. Лизаты наносили на колонки, неспецифически связанные белки отмывали 3-5 раз тем же буфером, но содержащим 50 мМ имидазола, после чего рекомбинантные белки субъединиц элюировали буфером, содержащим 300 мМ имидазола. Белки всех субъединиц наработаны в препаративных количествах.

Анализ фосфорилирования рекомбинантных субъединиц АТФ синтазы проводили в присутствии суммарного препарата протеинкиназ *S. fradiae* ATCC 19609, полученного аффинной хроматографией на цибакрон-Сефарозе. Для того, чтобы исключить искажение результатов за счет эндогенного фосфорилирования в препарате киназ, последние прединкубировали в присутствии немеченой АТФ.

Белки каждой из 8 субъединиц инкубировали с препаратом протеинкиназ *S. fradiae* ATCC 19609 и (γ-³²P)-АТФ в буферном растворе, затем проводили электрофорез меченых белков в SDS-ПААГ (рисунок 20, а). Включение радиоактивного фосфата в них определяли автордиографией. Для регистрации фосфорилированных белков полученный SDS-ПААГ экспонировали с рентгеновской пленкой KODAK MXG Film (100sh) (рисунок 20, б).

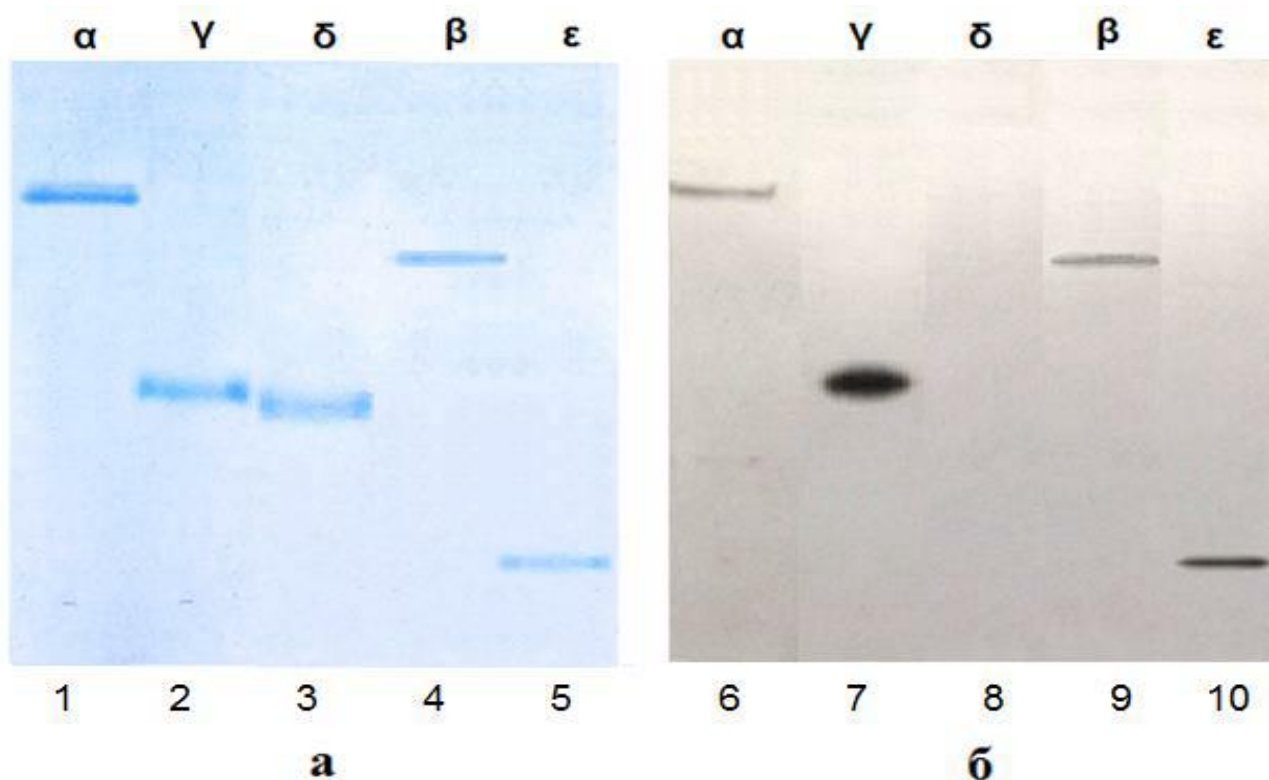


Рисунок 20. а – Электрофореграмма гелей после электрофореза рекомбинантных субъединиц α (1), γ (2), δ (3), β (4), ϵ (5); б – автордиограф фосфорилированных субъединиц α (6), γ (7), δ (8), β (9), ϵ (10) F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609.

Из полученных результатов видно, что наблюдается включение меченого фосфата в белки с молекулярными массами 75 и 56 кДа, представляющие собой слитые с тиоредоксином β - и γ -субъединицы АТФ-синтазы соответственно. Удельное мечение γ -субъединицы примерно на порядок выше, чем β -субъединицы. Наблюдается небольшое включение метки в белки с молекулярными массами 80 и 36 кДа, представляющие собой α - и ϵ -субъединицы. Включение меченого фосфата в другие субъединицы F_0 - и F_1 -части АТФ-синтазы (а, б, с и д) не обнаружено. Отсутствие включения также указывает на то, что в полученных рекомбинантных гибридных белках, слитых с тиоредоксином α -, β -, γ - и ϵ -субъединиц, модифицируются именно субъединицы АТФ-синтазы, а не тиоредоксин. Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что α -, β -, γ -

и ϵ -субъединицы F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса актиномицетов могут фосфорилироваться эндогенными СТПК.

3.5. Идентификация фосфорилированных белков во фракции мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609

С целью идентификации фосфорилированных белков оптимизированы условия выделения белков мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609, содержащих F_0F_1 -АТФ-синтазу.

Белки фракции мембранных везикул фосфорилированы *in vitro* с использованием (γ - ^{32}P)-АТФ. Фосфорилированные белки разделены методом двумерного электрофореза (рисунок 21).

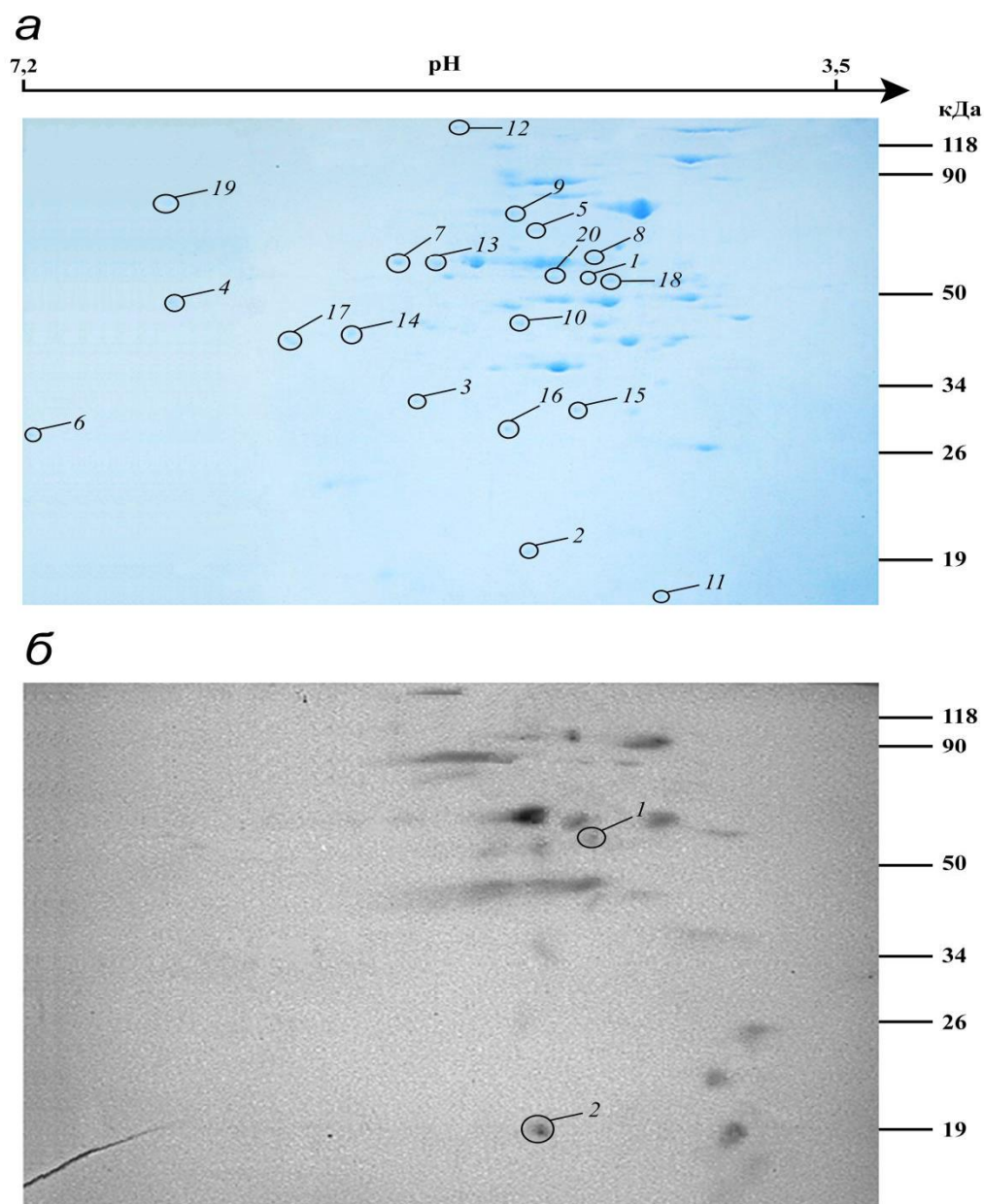


Рисунок 21. 2D SDS-PAGE белков мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609. *a* – Электрофореграмма геля, окрашенного Кумасси G250. *б* – автордиограмма. Масс-спектрометрическая идентификация отмеченных полипептидов: 1 – F₁-часть АТФ-синтазы, субъединица β; 2 – F₀-часть АТФ-синтазы, субъединица b.

С помощью масс-спектрометрического анализа идентифицировано 20 белков. Выявлено два белка, идентичных соответственно, β-субъединице F₁-части и b-субъединице F₀-части F₀F₁-АТФ-синтазы. Другие 18 идентифицированных белков можно разделить на семь функциональных групп (таблица 8). В функциональной группе «преобразование энергии и метаболизм жирных кислот» помимо β- и b-субъединиц представлены белки, которые могут быть связаны с

функционированием F_0F_1 -АТФ-синтазы. Отсутствие γ -субъединицы в препаратах может объясняться ее селективной потерей в ходе приготовления препаратов к электрофорезу.

Таблица 8. Основные белки с установленными функциями, идентифицированные во фракции мембранных везикул *Streptomyces fradiae* ATCC 19609, представленные на рисунке 19.

Функциональные группы	№*	Функция	Ген	Локализация, номер контига**	Мол. масса, кДа	pI
1. Преобразование энергии и метаболизм жирных кислот	1	β -субъединица F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы	<i>atpD</i>	0001 207730..209184	52,38	4,91
	2	α -субъединица F ₀ F ₁ -АТФ-синтазы	<i>atpF</i>	0001 203744..204301	20,23	5,16
	3	АВС-транспортер АТФ-связывающий белок	<i>SCO424</i> <i>0</i>	0068 16582..17502	31,78	5,54
	4	кротонил СоА редуктаза	<i>SCO647</i> <i>3</i>	0008 3364..4992	49,27	6,88
	5	изоцитратдегидрогеназа	<i>SCO700</i> <i>0</i>	0023 44255..46474	79,31	5,04
2. Метаболизм и транспорт углеводов	6	глицерофосфодиестераза	<i>SCO156</i> <i>5</i>	0015 122785..123618	30,64	7,21
	7	глюкоза-6-фосфатизомераза	<i>pgi</i>	0010 68231..69883	60,06	5,97
	8	фосфоенолпируват фосфотрансфераза	<i>SCO139</i> <i>1</i>	0045 53716..55386	57,36	4,89

3. Репарация	9	НАД-зависимая ДНК-лигаза	<i>ligA</i>	0001 334323..336530	80,83	5,16
	10	фактор элонгации Tu	<i>SCO1321</i>	0026 32423..33616	43,87	5,15
4. Трансляция, рибосомальные структуры и биогенез	11	50S рибосомальный белок L29	<i>SCO4710</i>	contig0026 46129..46518	13,44	4,61
	12	белок, аденелирующий аминокислоты	<i>SCO2198</i>	0004 62044..68697	232,26	5,56
	13	1-пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназа	<i>SCO5520</i>	0102 2059..3690	58,49	5,72
5. Транспорт и метаболизм аминокислот, биосинтез антибиотиков	14	сенсорный белок трансдукции <i>eryC1</i>	<i>SACTE_2966</i>	0080 4231..5403	41,33	6,20
	15	SAM-зависимая метилтрансфераза	<i>SCO0995</i>	0001 197491..198315	30,25	5,10
6. Посттрансляционные модификации и фолдинг	16	ацетилтрансфераза GCN5-семейства	<i>SCO0995</i>	0039 23628..24401	28,01	5,69
	17	оксидоредуктаза SCO4595	<i>SCO4595</i>	0010 4454..15731	44,52	6,41
	18	шаперон GroEL	<i>groEL</i>	0009 98884..100506	56,80	4,90

7. Транспорт и метаболизм неорганических ионов	19	ABC-транспортер металлов АТФазы	<i>SCO250</i> 5	0009 130411..132894	87,07	6,74
	20	Fe-S кластер сборки белка SufB	<i>SCO192</i> 5	0010 48435..49856	54,45	5,00

* Номера белков, обозначенных на рисунке 21.

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

3.6. Определение ингибирующего действия олигомицина А и его производных на активность F₀F₁-АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609

В ходе нашей работы определено ингибирующее действие олигомицина А на F₀F₁-АТФ-синтазу в препаратах инвертированных мембранных везикул (imv) *Streptomyces fradiae* ATCC19609, по методике, опубликованной в диссертационной работе к.б.н. Ватлина А.А. 2017г. Для модуляции клеточных процессов и активации мембран, образования протонного градиента, использовали восстановленный НАД (НАДН/NADH) (Inglede W. J. et al., 2010). В качестве положительного контроля использовался классический ингибитор F₀F₁-АТФ-синтазы - N, N-дициклогексилкарбодиимид (DCCD), который, как известно, связывается с с-субъединицей F₀ – части. Модификация с-субъединицы блокирует протонную транслокацию в F₀ – части и связанную с гидролизом активность АТФ F₁ – части (Masashi Toei et al., 2013). В качестве отрицательного контроля использовался левофлоксацин (lfx), конечная концентрация DCCD и lfx - 100 мкМ. АТФ-синтазную активность измеряли путем определения количества АТФ, с использованием системы люциферин / люцифераза (ATP bioluminescence assay kit HSII; Roche Applied Science) (Balemans W. et al., 2012). Данные представлены на рисунке 22 как средние с учетом стандартных отклонений.

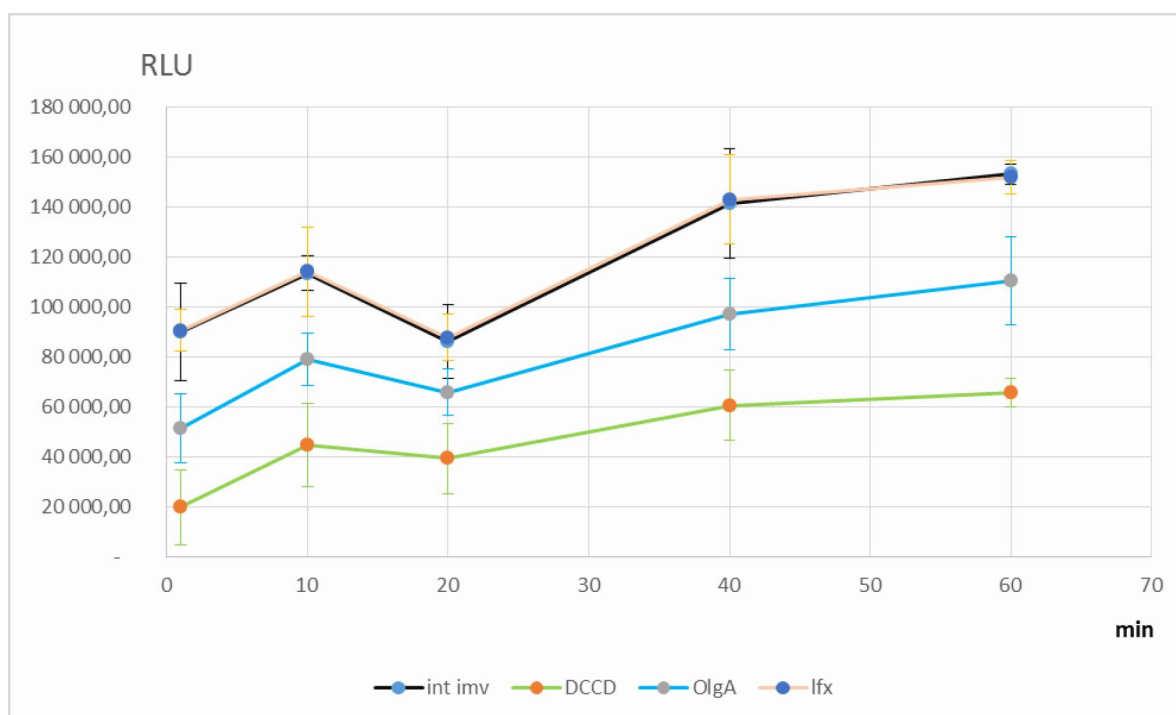


Рисунок 22. Кинетика синтеза АТФ F₀F₁-АТФ-синтазой:

интактные инвертированные мембранные везикулы *S.fradiae* ATCC19609 (int imv); везикулы *S.fradiae* ATCC19609, предобработанные левофлоксацином (lfx, 100мкМ), дициклогексилкарбодиимидом (DCCD, 100 мкМ), олигомицином А (olgA, 100 мкМ). На вертикальной оси: RLU- relative light units, на горизонтальной: интервалы времени в минутах (min)

Показано, что синтез АТФ F₀F₁-АТФ-синтазой в препаратах интактных инвертированных мембранных везикул *S.fradiae* ATCC19609 и везикул, предобработанных левофлоксацином, дициклогексилкарбодиимидом, олигомицином А линейно возрастает в интервале с 1 по 10 минуту; далее до 20 минуты отмечается резкий спад, что может быть связано с истощением субстрата (АДФ) или ингибирующим влиянием АТФ; последующее увеличение количества АТФ 20 – 60 мин. предположительно связано с двухфазной природой взаимодействия фермент – субстрат (АДФ) (Tomashek J.J. et al., 2003).

На основании полученных данных проведено сравнение ингибирующего действия дициклогексилкарбодиимида (DCCD) и олигомицина А (olgA) на F₀F₁ - АТФ-синтазу *S.fradiae* ATCC19609, результаты представлены на рисунке 23.

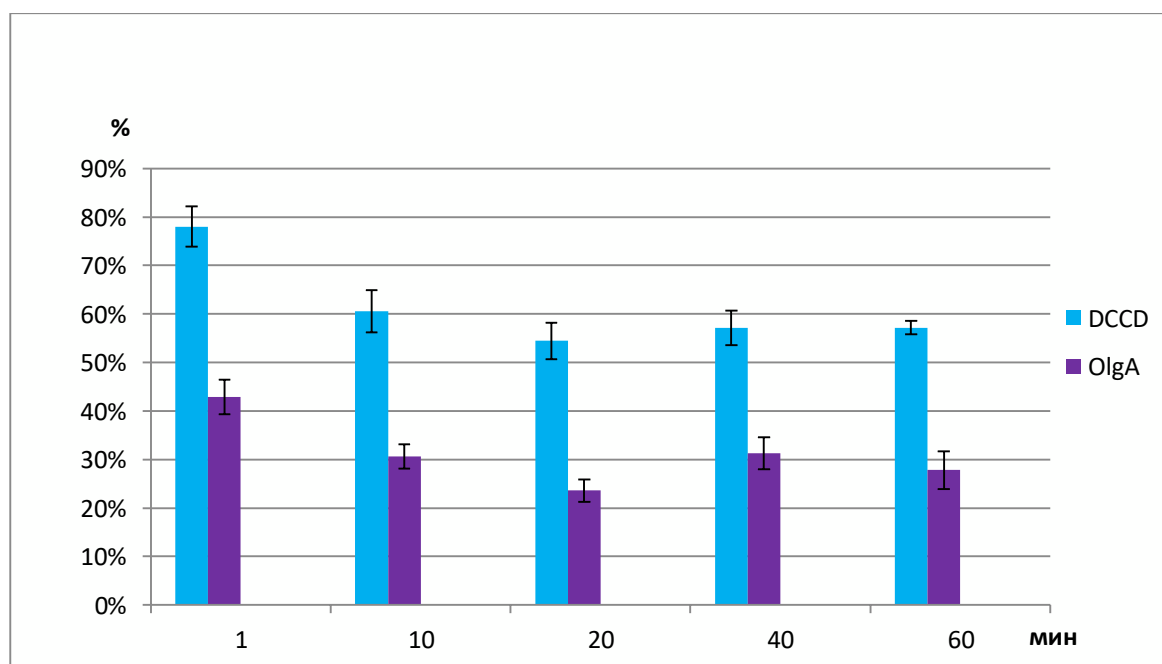


Рисунок 23. Ингибирование АТФ-синтазной активности F_0F_1 -АТФ-синтазы в препаратах инвертированных мембранных везикул *S.fradiae* ATCC 19609, предобработанных левофлоксацином (lfx, 100мкМ), дициклогексилкарбодиимидом (DCCD, 100 мкМ) и олигомицином А (olgA, 100 мкМ). На вертикальной оси: процент ингибирования (%), на горизонтальной: интервалы времени в минутах (мин).

Ингибирующее влияние DCCD на 10 минуте прохождения ферментативной реакции составило 61%, а далее наблюдалось незначительное снижение синтеза. Левофлоксацин не оказывал никакого влияния на синтез АТФ F_0F_1 - АТФ-синтазой *S.fradiae* ATCC19609, что подтвердило правильность выбора левофлоксацина в качестве отрицательного контроля. Олигомицин А (olgA, 100 мкМ) частично ингибирует АТФ-синтазную активность в среднем на 31%, что приблизительно в 2 раза ниже степени ингибирования DCCD (100 мкМ) на протяжении всего эксперимента (1-60 мин.). Таким образом, DCCD может использоваться как положительный контроль для поставленной ферментативной реакции.

На рисунке 24 показана зависимость синтеза АТФ F_0F_1 –АТФ – синтазой интактных инвертированных мембранных везикул, везикул предобработанных olgA, DCCD и lfx.

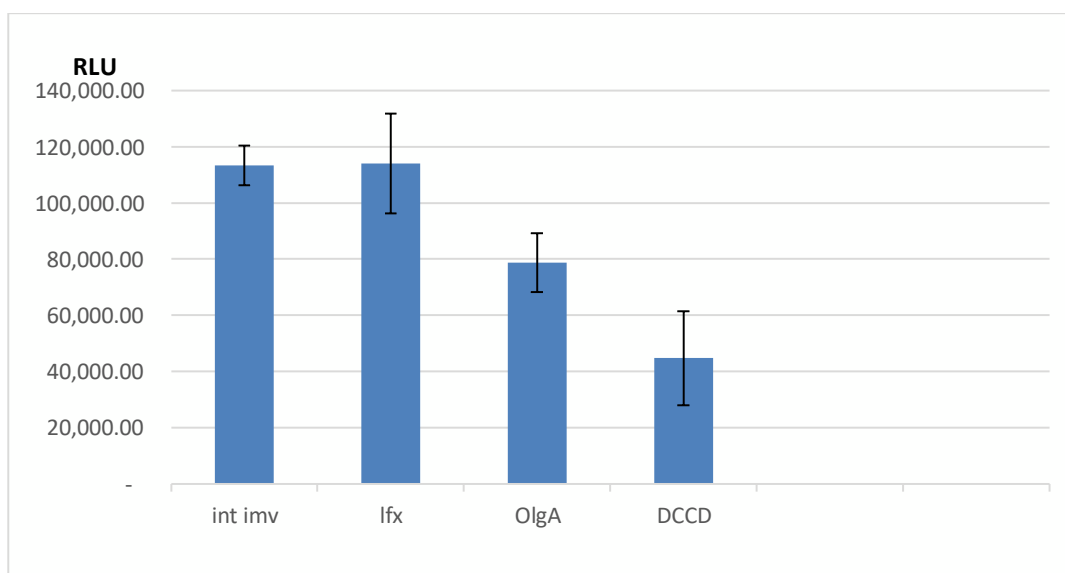
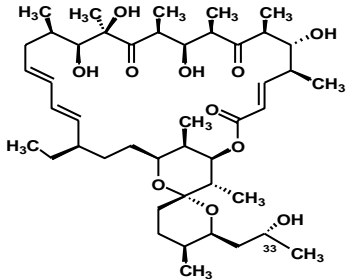
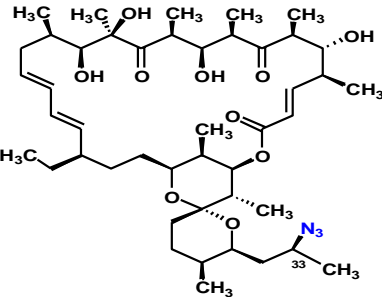
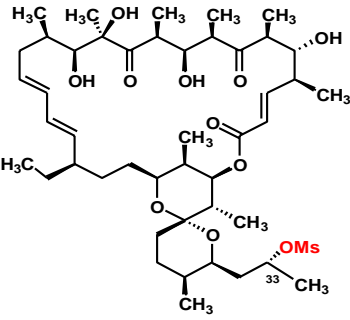
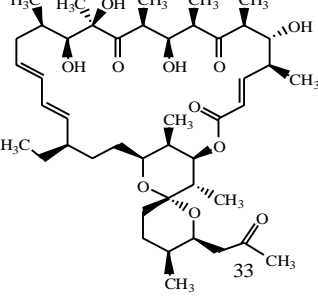


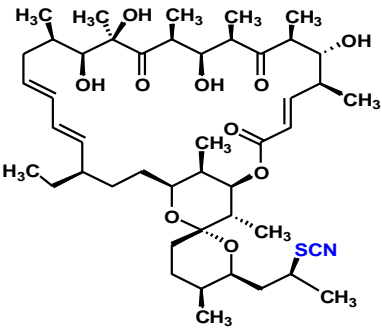
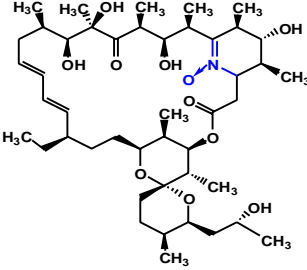
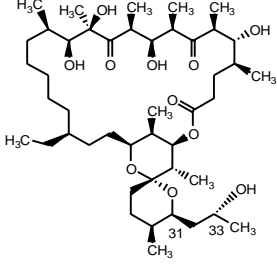
Рисунок 24. Зависимость синтеза АТФ F_0F_1 -АТФ-синтазой в препаратах интактных инвертированных мембранных везикул *S.fradiae* ATCC19609 (int imv); везикул *S.fradiae* ATCC19609, предобработанных левофлоксацином (lfx, 100 мкМ), дициклогексилкарбодиимидом (DCCD, 100 мкМ) и олигомицином А (olgA, 100 мкМ). На вертикальной оси: RLU- relative light units, на горизонтальной: интервал времени – 10 минут (min).

Данные экспериментов, а также результаты математической обработки представлены в приложении 3 (таблицы 5-9).

Из литературных источников известно, что олигомицин по С33-положению связывается с с-кольцом АТФ-синтазы, блокируя транслокацию протонов, перекрывая доступ к основному карбоксилу, а также образует водородные связи по макролактонному кольцу. В Институте по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе были синтезированы производные олигомицина А, содержащие модификации по с33-положению и по макролактонному кольцу. Изучено влияния олигомицина А и его производных (Olg1, Olg 2, Olg 3, Olg 4, Olg 17, Olg 18) на синтез АТФ в препаратах инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609, данные приведены в таблице 9.

Таблица 9. Определение ингибирующего действия производных олигомицина А на F₀F₁-АТФ-синтазу *S.fradiae* ATCC 19609.

Название вещества	Структурная формула	Ингибирование
Олигомицин А Olg A		31±2,5%
(33S)-азид-33-дезоксиолигомицин А Olg 2		53±7,4%
33-О-мезилолигомицин Olg 3		40±4,5%
33-дегидро-олигомицин Olg18 LСТА-2642		15±2,6%

<p>(33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицин А</p> <p>Olg 4</p>		<p>14±6,4%</p>
<p>Нитрон-олигомицин</p> <p>Olg 1</p>		<p>0%</p>
<p>Пергидро-олигомицин</p> <p>Olg 17</p> <p>LCTA-2644</p>		<p>0%</p>

Полученные данные позволяют судить о связи между структурой и функцией производных олигомицина А в отношении F_0F_1 -АТФ-синтазы. Производные, модифицированные по С33-положению проявляли различную активность:

- ингибирующее действие азидоолигомицина (Olg 2), мезилоолигомицина (Olg 3) превышает действие олигомицина А, приблизительно в 1,5 раз;
- дегидроолигомицин (Olg18), тиоцианатоолигомицин А (Olg 4) проявляли сниженную активность по сравнению с олигомицином А, приблизительно в 2 раза;
- нитрон-олигомицин (Olg 1), пергидро-олигомицин (Olg 17), модифицированный по макролактонному кольцу не оказывали влияния на F_0F_1 -АТФ-синтазу.

Т.о. были найдены производные, ингибирующая активность которых выше активности олигомицина А, в дальнейшем они могут использоваться, как наиболее эффективный инструмент для исследований комплекса. Показано, что модификации по макролактонному кольцу приводят к нарушению связывания АТФ-синтазы и олигомицина, что позволяет делать выводы о структурном взаимодействии ингибитора с F_0F_1 -АТФ-синтазой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы определены нуклеотидные последовательности генов субъединиц и структура кластера F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609, разработаны подходы для экспрессии генов в *E.coli* и очистки рекомбинантных белков 8 субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae*. Штаммы *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиды с клонированными генами субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы, разработанные методы выделения белков и выделенные рекомбинантные белки могут быть использованы в научно-исследовательских работах с последующим потенциальным применением в области практической медицины.

Впервые показано фосфорилирование δ -, γ -, β - α - и ϵ - субъединиц F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* АТСС 19609. Фосфорилирование значительно влияет на свойства белка, что связано с химической природой фосфатной группы, формированием водородных связей и электростатическим взаимодействием с компонентами белковой молекулы. Изменение пространственной структуры белка влияет на его активность и способность связываться с другими молекулами. Процессы фосфорилирования или дефосфорилирования регулируют функциональную активность белка, усиливает её, или инактивирует данный белок функционально.

Определено ингибирующее действия олигомицина А и 6 его полусинтетических производных на активность F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* АТСС 19609. Метод изучения ингибирующего влияния олигомицина А и его производных на синтез АТФ F_0F_1 -АТФ-синтазой инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* может быть использован для предварительного отбора соединений – потенциальных лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что кластер генов F_0F_1 -АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* АТСС 19609 имеет консервативную структуру, характерную для рода *Streptomyces*. Внутри рода *Streptomyces* наиболее консервативными являются субъединицы α , β , ν и ς более 83% идентичности аминокислотных последовательностей, менее консервативными являются субъединицы γ , δ , ϵ , и α более 72% идентичности аминокислотных последовательностей.
2. Рекомбинантные белки γ -, β - α - и ϵ -субъединиц F_1 -части F_0F_1 -АТФ-синтазы *S. fradiae* АТСС 19609 фосфорилируются суммарным препаратом серин-треониновых протеинкиназ в составе клеточного экстракта.
3. Субъединицы β и ν F_0F_1 -АТФ-синтазного комплекса фосфорилируются во фракции мембранных везикул.
4. Производные олигомицина А, модифицированные по макролактонному кольцу и по С33-положению в разной степени влияют на ингибирование синтеза АТФ, наибольшую активность проявляет (33S)-азид-33-дезоксидолигомицин А (Olg 2), которая превышает активность олигомицина А в 1,7 раз.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- СТПК – серин-треониновые протеинкиназы
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АДФ - аденозиндифосфат
- ПТМ – посттрансляционная модификация
- PMF - Proton motive force
- IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology
- PASTA – penicillin-binding protein and ser/thr kinase-associated
- ФНА – forkhead associated
- АВС - ATP-binding cassette
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- Thr – threonine/ Tyr – tyrosine/ Ser - serine
- УЗД - ультразвуковой дезинтегратор
- SDS – sodium dodecyl sulfate (додецилсульфат натрия)
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПААГ – полиакриламидный гель
- OXPHOS - Oxidative phosphorylation
- OD – optical density (оптическая плотность)
- ТВЕ – tris-borate-EDTA
- ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG)
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ТХУ – трихлоруксусная кислота
- ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид (PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride)
- SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле (*polyacrylamide gel electrophoresis*) в присутствии додецилсульфата натрия (*sodium dodecyl sulfate*)

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю с.н.с. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН к.б.н. **Марии Георгиевне Алексеевой** и заведующему лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН д.б.н., проф. **Валерию Николаевичу Даниленко** за руководство, наставничество и помощь в работе.

Автор также выражает благодарность всему коллективу лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН за постоянную поддержку, особая благодарность:

Диларе Анваровне Мавлетовой, Ольге Борисовне Беккер за наставничество и помощь на разных стадиях выполнения работы,

Наталье Владимировне Захаревич, Марине Сергеевне Чекалиной за помощь в освоении биоинформатических методов,

Венере Закировне Незаметдиновой, Ксении Михайловне Климиной, Кириллу Владимировичу Шуру, Алексею Александровичу Ватлину, Дмитрию Антоновичу Маслову.

Автор также выражает благодарность зав. лабораторией изотопных методов анализа ИБХ РАН д.х.н. **Юрию Самойловичу Скоблову** за возможность и помощь в проведении части экспериментов на базе лаборатории изотопных методов.

Отдельная благодарность зав. лаб. механизмов гибели опухолевых клеток НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина Минздрава России, д.м.н. **Александрю Альбертовичу Штилю** за помощь на разных стадиях выполнения работы и ценные замечания, сделанные при рецензировании данной работы.

Благодарность к.б.н. **Елизарову Сергею Михайловичу** за помощь на разных стадиях выполнения работы.

Особая благодарность зав. лаб. разработки методов поиска биологически активных соединений НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе д.б.н. **Алексею Сергеевичу Тренину** и г.н.с. лаб. белковой инженерии ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов -НИЦ «Курчатовский институт» к.б.н. **Татьяне Александровне Воейковой** за ценные замечания, сделанные при рецензировании данной работы перед ее апробацией.

Благодарность научным сотрудникам лаборатории химической трансформации антибиотиков НИИ по изысканию новых антибиотиков им Г.Ф. Гаузе, зав. лаб., д.х.н. **Андрея Егоровича Щекотихина** и с.н.с., к.б.н. **Людмилу Николавену Лысенкову.**

Список литературы:

1. Алексеева М.Г., Елизаров С.М., Беккер О.Б., Любимова И.К., Даниленко В.Н. F₀F₁-АТФ-синтаза стрептомицетов: модулирование активности и чувствительности к олигомицину серин-треониновыми протеинкиназами. Биологические мембраны. 2009. Т.26. №1. С.41-49
2. Алексеева М.Г., Мирончева Т.А., Мавлетова Д.А., Елизаров С.М., Захаревич Н.В., Даниленко В.Н. Биохимическая и структурная характеристика F-АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609. Биохимия. 2015. Т. 80. № 3. С. 358-373.
3. Ватлин А.А. Исследование генетических механизмов устойчивости и чувствительности штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А и его производным. Диссертация к.б.н./03.02.07. Москва. 2017г. С.77-81.
4. Даниленко А.Н., Бибикова М.В., Спиридонова И.А., Грамматикова Н.Э., Катлинский А.В. Физико-химические свойства и структурные исследования олигомицина SC-II, продуцируемого *Streptomyces virginiae* 17. Антибиотики и химиотерапия. - 2012. - Т. 57, № 11-12. - С. 5-7
5. МОБИХим 2015: «Тест-система для скрининга и отбора новых природных и полусинтетических производных олигомицина А, перспективных антиактиномикозных препаратов, на основе *Streptomyces fradiae* ATCC 19609». Новый Свет, Крым. Сборник тезисов. 2015 г. С.-81.
6. Никитин М.А. Происхождение мембран и мембранной биоэнергетики. Химия и Жизнь. 2013. № 9
7. Омельчук О.А., Лысенкова Л.Н., Королев А.М., Надысев Г.Я., Ватлин А.А., Беккер О.Б., Мавлетова Д.А. Модификация макролидного антибиотика олигомицина - ингибитора АТФ синтазы. 2 междисциплинар. симп. «МОБИ-СНЕМ 2015»: Тез. докл. - п. Новый Свет. - п. Новый Свет, 2015. С. - 171

8. Adachi K., Oiwa K, Nishizaka T, Furuike S, Noji H, Itoh H, Yoshida M, Kinoshita K Jr. Coupling of rotation and catalysis in F(1)-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation. *Cell*. 2007. 130(2):309-21.
9. Alekseeva M.G., Bekker O.B., Lubimova I.K., Danilenko V.N., Elizarov S.M. FoF1-ATP synthase of streptomycetes: modulation of activity and oligomycin resistance by protein ser/thr kinases. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*. 2009. T. 3. № 1. C. 16-23.
10. Altamura N., Capitanio N, Bonnefoy N, Papa S, Dujardin G. The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS*. 1996. 382(1–2):111
11. An I. Jonckheere, Jan A. M. Smeitink, and Richard J. T. Rodenburg. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inher Metab Dis*. 2012. 35(2): 211–225.
12. Arakaki N., Nagao T, Niki R, Toyofuku A, Tanaka H, Kuramoto Y, Emoto Y, Shibata H, Magota K, Higuti T. Possible role of cell surface H⁺-ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cancer Res*. 2003. 1(13):931-9.
13. Arakaki N., Kita T, Shibata H, Higuti T. Cell-surface H⁺-ATP synthase as a potential molecular target for anti-obesity drugs. *FEBS Lett*. 2007. 581(18):3405-9.
14. Azarashvili T., I. Odinkova, A. Bakunts, V. Ternovsky, O. Krestinina, J. Tyynelä, N.-E.L. Saris, Potential role of subunit c of F₀F₁-ATPase and subunit c of storage body in the mitochondrial permeability transition. Effect of the phosphorylation status of subunit c on pore opening. *Cell Calcium* 55. 2014. 69–77
15. Balemans W., Luc Vranckx, a Nacer Lounis, Ovidiu Pop, Jérôme Guillemont, Karen Vergauwen, Selena Mol, Ron Gilissen, Magali Motte, David Lançois, Miguel De Bolle, Kristien Bonroy, Holger Lill, Koen Andries, Dirk Bald and Anil Koula. Novel Antibiotics Targeting Respiratory ATP Synthesis in Gram-

- Positive Pathogenic Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. vol. 56 no. 8 4131-4139
16. Barriuso-Iglesias M., Barreiro C, Flechoso F, Martín JF. Transcriptional analysis of the F F₀F₁ -ATPase operon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 reveals strong induction by alkaline pH. *Microbiology.* 2006. 152(Pt 1):11-21.
 17. Bekker O.B., Klimina KM, Vatlin AA, Zakharevich NV, Kasianov AS, Danilenko VN. Draft Genome Sequence of *Streptomyces fradiae* ATCC 19609, a Strain Highly Sensitive to Antibiotics. *Genome Announc.* e01247-14.
 18. Bernardi P., Di Lisa F The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2015. 78:100–106.
 19. Bernardi P., Di Lisa F., Fogolari F, Lippe G. From ATP to PTP and back: a dual function for the mitochondrial ATP synthase. *Circ Res.* 2015. 116:1850–1862
 20. Berger K., Sivars U, Winzell MS, Johansson P, Hellman U, Rippe C, Erlanson-Albertsson C. Mitochondrial ATP synthase-a possible target protein in the regulation of energy metabolism in vitro and in vivo. *Nutr Neurosci.* 2002. 5(3):201-10.
 21. Beyenbach K.W., Wiczorek H. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol.* 2006. 209(Pt 4):577-89.
 22. Boja E. S., Phillips D., French S. A., Harris R. A., Balaban R. S. Quantitative mitochondrial phosphoproteomics using iTRAQ on an LTQ-Orbitrap with high energy collision dissociation. *J. Proteome Res.* 2009. 9, 4665–4675
 23. Bonora M., Wieckowski MR, Chinopoulos C, Kepp O, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene.* 2015. 34:1608.
 24. Borghese R., Turina P, Lambertini L, Melandri BA. The *atpIBEXF* operon coding for the F₀ sector of the ATP synthase from the purple nonsulfur photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Arch Microbiol.* 1998. 170(5):385-8.

25. Boyer P.D. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* 1997. 66:717-49.
26. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. 72, 248-254.
27. Brandt K., Maiwald S, Herkenhoff-Hesselmann B, Gnirß K, Greie JC, Dunn SD, Deckers-Hebestreit G. Individual interactions of the b subunits within the stator of the Escherichia coli ATP synthase. *J Biol Chem.* 2013. 288(34):24465-79.
28. Burrell H.E., Wlodarski B, Foster BJ, Buckley KA, Sharpe GR, Quayle JM, Simpson AW, Gallagher JA. Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface. *J Biol Chem.* 2005. 280(33):29667-76.
29. Burwick N.R., Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, Capaldi RA, Kenan DJ, Pizzo SV. An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 2005. 280(3):1740-5.
30. Capaldi R.A., Aggeler R. Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci.* 2002. 27(3):154-60.
31. Carter G.T. Structure Determination of Oligomycins A and C. *J. Org. Chem.* 1986. 51: 4264-4271
32. Champagne E., Martinez LO, Collet X, Barbaras R. Ecto-F1Fo ATP synthase/F1 ATPase: metabolic and immunological functions. *Curr Opin Lipidol.* 2006. 17(3):279-84.
33. Cohen P. The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2002. 4(5):E127-30.
34. Cosma C.L., Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2003. 57:641-76.
35. Covian R, R.S. Balaban, Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012. 940–966.
36. Chen X, Zhang W., Zhang B., Zhou J., Wang Y., Yang Q., Ke Y., He H. Phosphoproteins regulated by heat stress in rice leaves. *Proteome Sci.* 2011. 9:37.

37. Chi S.L., Pizzo SV. Cell surface F₁F_o ATP synthase: a new paradigm? *Ann Med.* 2006. 38(6):429-38.
38. Cho H.J., Balasubramanyam M, Chernaya G, Gardner JP, Aviv A, Reeves JP, Dargis PG, Christian EP. Modelling the Binding of Oligomycin to ATP Synthase. *Biochem J.* 1997. 324:971
39. Coskun U., Chaban YL, Lingl A, Müller V, Keegstra W, Boekema EJ, Grüber G. Structure and subunit arrangement of the A-type ATP synthase complex from the archaeon *Methanococcus jannaschii* visualized by electron microscopy. *J Biol Chem.* 2004. 279(37):38644-8.
40. Cozzone A.J. Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol.* 1988. 42: 97–125.
41. Covian R. and Robert S. Balaban corresponding author Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012. 303(8): H940–H966.
42. Cramer W.A., Knaff DB. *Energy Transduction in Biological Membranes: A Textbook of Bioenergetics.* Springer-Verlag; 1990.
43. Dabbeni-Sala F., Amit Kumar Rai and Giovanna Lippe. F₀F₁ ATP Synthase: A Fascinating Challenge for Proteomics. *Proteomics - Human Diseases and Protein Functions.* 2012.
44. Das B., Mondragon MO, Sadeghian M, Hatcher VB, Norin AJ. A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H⁺ transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines. *J Exp Med.* 1994. 180(1):273-81.
45. Davies K.M., C. Anselmi, I. Wittig, J.D. Faraldo-Gómez, W. Kühlbrandt, Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109. 2012. 13602–13607
46. Deamer D.W. The first living systems: a bioenergetic perspective. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997. 61(2):239-61.

47. Deckers-Hebestreit G., Altendorf K. The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. *Annu Rev Microbiol.* 1996. 50:791-824.
48. De Meirleir L., Seneca S, Lissens W, Schoentjes E, Desprechins B. Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene. *Pediatr Neurol.* 1995. 13(3):242-6.
49. Di Pancrazio F., Bisetto E., Alverdi V., Mavelli I., Esposito G., Lippe G. Differential steady-state tyrosine phosphorylation of two oligomeric forms of mitochondrial F₀F₁ATP synthase: a structural proteomic analysis. *Proteomics.* 2006. 6: 921–926
50. Dimroth P. Primary sodium ion translocating enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1997. 1318 (1-2): 11-51.
51. Drory O., Nelson N. The emerging structure of vacuolar ATPases. *Physiology (Bethesda).* 2006. 21:317-25.
52. Elizarov S.M., Mironov, V.A., and Danilenko, V.N. Calcium-induced alterations in the functioning of protein serine/threonine and tyrosine kinases in *Streptomyces fradiae* cells, *IUBMB Life.* 2000. 50: 139–143.
53. Elizarov S.M., and Danilenko, V.N. Multiple phosphorylation of membrane-associated calcium-dependent protein serine/threonine kinase in *Streptomyces fradiae*, *FEMS Microbiol Lett.* 2001. 202:135–138.
54. Enomoto Y., Shiomi K, Matsumoto A, Takahashi Y, Iwai Y, Harder A, Kölbl H, Woodruff HB, Omura S. Isolation of a new antibiotic oligomycin G produced by *Streptomyces* sp. WK-6150. *J Antibiot (Tokyo).* 2001. 54(3):308-13.
55. Falk G., Hampe A, Walker JE. Nucleotide sequence of the *Rhodospirillum rubrum* atp operon. *Biochem J.* 1985. 228(2):391-407.
56. Falk G., Walker JE. DNA sequence of a gene cluster coding for subunits of the F₀ membrane sector of ATP synthase in *Rhodospirillum rubrum*. Support for modular evolution of the F₁ and F₀ sectors. *Biochem J.* 1988. 254(1):109-22.

57. Feniouk B.A., Suzuki T, Yoshida M. The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of FOF1-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1757(5-6):326-38.
58. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007. 11:917-29.
59. Futai M., Noumi T, Maeda M. Mechanism of F1-ATPase studied by the genetic approach. *J Bioenerg Biomembr*. 1988. 20(4):469-80.
60. Futai M., Noumi T, Maeda M. ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu Rev Biochem*. 1989. 58:111-36.
61. Gajadeera C.S., Weber J. Escherichia coli F1Fo-ATP synthase with a b/δ fusion protein allows analysis of the function of the individual b subunits. *J Biol Chem*. 2013. 288(37):26441-7.
62. Gay N.J. Construction and characterization of an Escherichia coli strain with a uncI mutation. *J Bacteriol*. 1984. 158(3):820-5.
63. Gaballo A., Abbrescia A, Palese LL, Micelli L, di Summa R, Alifano P, Papa S. Structure and expression of the atp operon coding for F1F0-ATP synthase from the antibiotic-producing actinomycete Nonomurea sp. ATCC 39727. *Res Microbiol*. 2006. 157(7):675-83.
64. Gay N.J., Walker JE. The atp operon: nucleotide sequence of the promoter and the genes for the membrane proteins, and the delta subunit of Escherichia coli ATP-synthase. *Nucleic Acids Res*. 1981. 9(16):3919-26.
65. Gledhill J.R., M.G. Montgomery, A.G.W. Leslie, J.E. Walker, How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria, *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A*. 2007. 15671–15676
66. Gogarten J.P., Kibak H, Dittrich P, Taiz L, Bowman EJ, Bowman BJ, Manolson MF, Poole RJ, Date T, Oshima T, et al. Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989. 86(17):6661-5.

67. Gogarten J.P., Starke T, Kibak H, Fishman J, Taiz L. Evolution and isoforms of V-ATPase subunits. *J Exp Biol.* 1992. 172:137-47.
68. Grażyna Nowak and Diana Bakajsova. Protein Kinase C- α Interaction with F₀F₁-ATPase Promotes F₀F₁-ATPase Activity and Reduces Energy Deficits in Injured Renal Cells. *J Biol Chem.* 2015. 290(11): 7054–7066.
69. Grimsrud P.A. , Carson JJ, Hebert AS, Hubler SL, Niemi NM, Bailey DJ, Jochem A, Stapleton DS, Keller MP, Westphall MS, Yandell BS, Attie AD, Coon JJ, Pagliarini DJ. A quantitative map of the liver mitochondrial phosphoproteome reveals posttranslational control of ketogenesis. *Cell Metab.* 2012. 16(5):672-83.
70. Hansford R.G. Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *J Bioenerg Biomembr.* 1994. 26(5):495-508.
71. Hase C.C., Fedorova ND, Galperin MY, Dibrov PA: Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001. 65 (3): 353-70.
72. Hensel M. Deckers-Hebestreit G, Altendorf K. Purification and characterization of the F₁ portion of the ATP synthase (F₁F₀) of *Streptomyces lividans*. *Eur J Biochem.* 1991. 202(3):1313-9.
73. Hensel M., Ahmus H. Deckers-Hebestreit G. The ATP synthase of *Streptomyces lividans*: characterization and purification of the F₁F₀ complex. *Biochim. et biophys. acta.* 1991. V. 1274. P. 101–108.
74. Hicks D.B., Wang Z, Wei Y, Kent R, Guffanti AA, Banciu H, Bechhofer DH, Krulwich TA. A tenth atp gene and the conserved atpI gene of a *Bacillus atp* operon have a role in Mg²⁺ uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(18):10213-8.
75. Hicks D.B., Liu J, Fujisawa M, Krulwich TA. F₁F₀-ATP synthases of alkaliphilic bacteria: lessons from their adaptations. *Biochim Biophys Acta.* 2010. 1797(8):1362-77.
76. Hilario E., Gogarten JP. Horizontal transfer of ATPase genes--the tree of life becomes a net of life. *Biosystems.* 1993. 31(2-3):111-9.

77. Hilario E., Gogarten JP. The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits. *J Mol Evol.* 1998. 46(6):703-15.
78. Højlund K., Wrzesinski K., Larsen P. M., Fey S. J., Roepstorff P., Handberg A., Dela F., Vinten J., McCormack J. G., Reynet C., Beck-Nielsen H. Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase β -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J. Biol. Chem.* 2003. 278: 10436–10442
79. Hong S., Pedersen PL. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008. 72(4):590-641.
80. Humphrey S.J., James DE2, Mann M3. Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2015. 26(12):676-87.
81. Hüttemann M., Lee I., Samavati L., Yu H., Doan J. W. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. 1773:1701–1720
82. Hüttemann M., Lee I., Pecinova A., Pecina P., Przyklenk K., Doan J. W. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2008. 40: 445–456
83. Huttlin E.L., M.P. Jedrychowski, J.E. Elias, T. Goswami, R. Rad, S.A. Beausoleil, J. Villén, W. Haas, M.E. Sowa, S.P. Gygi, A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression, *Cell.* 2010. 1174–1189
84. Iino R., Murakami T, Iizuka S, Kato-Yamada Y, Suzuki T, Yoshida M. Real-time monitoring of conformational dynamics of the epsilon subunit in F1-ATPase. *J Biol Chem.* 2005. 280(48):40130-4.
85. Iino R., Hasegawa R, Tabata KV, Noji H. Mechanism of inhibition by C-terminal alpha-helices of the epsilon subunit of *Escherichia coli* FoF1-ATP synthase. *J Biol Chem.* 2009. 284(26):17457-64.

86. Ilan Smoly, Netta Shemesh, Michal Ziv-Ukelson, Anat Ben-Zvi, and Esti Yeger-Lotem An Asymmetrically Balanced Organization of Kinases versus Phosphatases across Eukaryotes Determines Their Distinct Impacts. *PLoS Comput Biol.* 2017. 13(1): e1005221.
87. Ingledew W. J. and R. K. Poole. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 1984. 48:222–271.;
88. Senior, A. E., S. Nadanaciva, and J. Weber. The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim. Biophys.* 2002. 1553:188–211
89. Price, C. E., and A. J. M. Driessen. Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys.* 2010. 1803:748–766.).
90. Inoue H., Nojima, H., and Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene*. 1990. **96**: 23–28.
91. Itoh H., Takahashi A, Adachi K, Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K. Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature*. 2004. 427(6973):465-8.
92. Iwata M., Imamura H, Stambouli E, Ikeda C, Tamakoshi M, Nagata K, Makyio H, Hankamer B, Barber J, Yoshida M, Yokoyama K, Iwata S. Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101(1):59-64.
93. Johnson K.M., Chen X, Boitano A, Swenson L, Opiari AW Jr, Glick GD. Identification and validation of the mitochondrial F1F0-ATPase as the molecular target of the immunomodulatory benzodiazepine Bz-423. *Chem Biol*. 2005 Apr;12(4):485-96.
94. Johnson L.N., Barford D. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 1993. 22 (1): 199–232.
95. Kabaleeswaran V., Puri N, Walker JE, Leslie AG, Mueller DM. Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F1 ATPase. *EMBO J*. 2006. 25(22):5433-42.

96. Kane L. A., Yung C. K., Agnetti G., Neverova I., Van Eyk J. E. Optimization of paper bridge loading for 2-DE analysis in the basic pH region: application to the mitochondrial subproteome. *Proteomics*. 2006. 6: 5683–5687
97. Kane L. A., Youngman M. J., Jensen R. E., Van Eyk J. E. Phosphorylation of the F1F0 ATP synthase β subunit: functional and structural consequences assessed in a model system. *Circ. Res.* 2010. 106, 504–513
98. Kato Y., Matsui T, Tanaka N, Muneyuki E, Hisabori T, Yoshida M. Thermophilic F1-ATPase is activated without dissociation of an endogenous inhibitor, epsilon subunit. *J Biol Chem*. 1997. 272(40):24906-12.
99. Kato-Yamada Y., Noji H, Yasuda R, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F1-ATPase. *J Biol Chem*. 1998. 273(31):19375-7.
100. Kenan D.J., Wahl ML. Ectopic localization of mitochondrial ATP synthase: a target for anti-angiogenesis intervention? *J Bioenerg Biomembr*. 2005. 37(6):461-5.
101. Kenelly P.J. Protein Phosphorylation-Desphosphorylation and Signal Processing in the Archaea. In: Witzany G (ed). *Biocommunication of Archaea*. 1996. 213-234.
102. Kieser T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. *INTERNATL MICROBIOL*. 2000. 3:259–265
103. Kim B. S., S. S. Moon, and B. K. Hwang. Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Can. J. Bot.* 1999. 77:850-858.
104. Kim B.W., Choo HJ, Lee JW, Kim JH, Ko YG. Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts. *Exp Mol Med*. 2004. 36(5):476-85.
105. Ko Y. H., Pan W., Inoue C., Pedersen P. L. Signal transduction to mitochondrial ATP synthase: Evidence that PDGF-dependent phosphorylation of

- the δ -subunit occurs in several cell lines, involves tyrosine, and is modulated by lysophosphatidic acid. *Mitochondrion*. 2002. 1, 339–348
106. Kol S., Majczak W, Heerlien R, van der Berg JP, Nouwen N, Driessen AJ. Subunit a of the F(1)F(0) ATP synthase requires YidC and SecYEG for membrane insertion. *J Mol Biol*. 2009. 390(5):893-901.
107. Konings W.N., Albers SV, Koning S, Driessen AJ. The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002. 81(1-4):61-72.
108. Konings W.N. Microbial transport: adaptations to natural environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006. 90(4):325-42.
109. Koul A., Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*. 2011. 469(7331):483-90.
110. Koumandou V.L., Kossida S. Evolution of the F₀F₁ ATP synthase complex in light of the patchy distribution of different bioenergetic pathways across prokaryotes. *PLoS Comput Biol*. 2014. 10(9)
111. Kuhnert W.L., Quivey Jr RG Jr. Genetic and biochemical characterization of the F-ATPase operon from *Streptococcus sanguis* 10904. *J Bacteriol*. 2003. 185(5):1525-33.
112. Kullen M.J. and Todd R. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F₁F₀-ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Molecular Microbiology*. 1999. 33(6): 1152-1161.
113. Lardy H.A., Johnson D, McMurray W.C. Antibiotics as tools for metabolic studies. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems. *Arch Biochem Biophys*. 1958. 78:587 –597
114. Lapierre P., Shial R, Gogarten JP. Distribution of F- and A/V-type ATPases in *Thermus scotoductus* and other closely related species. *Syst Appl Microbiol*. 2006. 29(1):15-23.
115. László Szilágyi; János Samu; Ilona Harsányi, Structure Elucidation of Two Acetylated Derivatives of Oligomycin A. *Spectroscopy Letters*. 1995. 699-707

116. Liu X., Godwin M. L., Nowak G. Protein kinase C- α inhibits the repair of oxidative phosphorylation after S-(1,2-dichlorovinyl)-l-cysteine injury in renal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004. 287, F64–F73
117. Lysenkova L.N., K.F Turchin, V.N Danilenko, A.M Korolev and M.N Preobrazhenskaya, The first examples of chemical modification of oligomycin A, *The Journal of Antibiotics.* 2010. 63:17-22
118. Lysenkova L.N., Konstantin F. Turchin, Alexander M. Korolev, Lyubov G. Dezhenkova, O. B. Bekker, Alexander A. Shtil, Valery N. Danilenko, Maria N. Preobrazhenskaya Synthesis and cytotoxicity of oligomycin A derivatives modified in the side chain *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2013. 2918–2924
119. Lysenkova L.N., Turchin, K.F., Korolev, A.M., Danilenko, V.N., Bekker, O.B., Dezhenkova, L.G., Shtil, A.A., and Preobrazhenskaya, M.N. Study on retroaldol degradation products of antibiotic oligomycin A, *J. Antibiot.Tokyo.* 2014. 67: 153–158.
120. Lysenkova L.N., Oleg Y. Saveljev, b Alexander M. Korolev,a Valery N. Danilenko, Olga B. Bekker, Dilara A. Mavletova, Aleksey A. Vatlin, Olga A. Omelchuk, and Andrey E. Shchekotihin. Synthesis of 33-(R,S)-bromo-33-deoxyoligomycin a *Macroheterocycles.* 2016. 9(3) 307-313
121. Lysenkova L.N., Saveljev OY, Grammatikova NE, Tsvetkov VB, Bekker OB, Danilenko VN, Dezhenkova LG, Bykov EE1, Omelchuk OA, Korolev AM, Shchekotikhin AE. Verification of oligomycin A structure: synthesis and biological evaluation of 33-dehydrooligomycin A. *J Antibiot. Tokyo.* 2017. 70(8):871-877.
122. Macek B.; Mijakovic, I.; Olsen, J.; Gnad, F; Kumar, C.; Jensen, P. The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis.* *Mol. Cell. Proteomics.* 2007. 6: 697–707.
123. Masashi Toei, Hiroyuki Noji. Single-molecule Analysis of F0F1-ATP Synthase Inhibited by N,N-Dicyclohexylcarbodiimide. *JBC Papers in Press.* 2013. 113-8656

124. Mierendorf R., Yeager, K., and Novy, R. Innovations, *Newsletter of Novagen*. 1994. 1: 1–3.
125. Moser T.L., Stack M.S. , Asplin I, Enghild JJ, Højrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96(6):2811-6.
126. Moser T.L., Kenan DJ, Ashley TA, Roy JA, Goodman MD, Misra UK, Cheek DJ, Pizzo SV. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 98(12):6656-61.
127. Moser T.L., Stack MS, Wahl ML, Pizzo SV. The mechanism of action of angiostatin: can you teach an old dog new tricks? *Thromb Haemost*. 2002. 87(3):394-401.
128. Mulkidjanian A.Y., Makarova KS, Galperin MY, Koonin EV. Inventing the dynamo machine: the evolution of the F-type and V-type ATPases. *Nat Rev Microbiol*. 2007. 5(11):892-9.
129. Mulkidjanian A.Y., Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Evolutionary primacy of sodium bioenergetics. *Biol Direct*. 2008. 3:13.
130. Müller V., Grüber G. ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell Mol Life Sci*. 2003. 60(3):474-94.
131. Müller V., Lemker T, Lingl A, Weidner C, Coskun U, Grüber G. Bioenergetics of archaea: ATP synthesis under harsh environmental conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2005;10(2-4):167-80. Murata T., Yamato I, Kakinuma Y, Leslie AG, Walker JE. Structure of the rotor of the V-Type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science*. 2005. 308(5722):654-9.
132. Müller V., Lingl A., Lewalter K, Fritz M. ATP synthases with novel rotor subunits: new insights into structure, function and evolution of ATPases. *J Bioenerg Biomembr*. 2005. 37(6):455-60.

133. Nakanishi-Matsui M., Futai M. Stochastic proton pumping ATPases: from single molecules to diverse physiological roles. *IUBMB Life*. 2006. 58(5-6):318-22.
134. Nesci S., Trombetti F, Ventrella V, Pagliarani A. The c-Ring of the F1FO-ATP Synthase: Facts and Perspectives. *J Membr Biol*. 2016. 249(1-2):11-21.
135. Nesci S., Trombetti F, Ventrella V, Pagliarani A. Post-translational modifications of the mitochondrial F1FO-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 2017. 2902-2912.
136. Nichols B.J., Denton RM. Towards the molecular basis for the regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Mol Cell Biochem*. 1995. 149-150:203-12.
137. Noji H., Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K Jr. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*. 1997. 386(6622):299-302.
138. O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem*. 1975. **250**: 4007–4021.
139. Okuno D., Iino R, Noji H. Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. *J Biochem*. 2011. 149(6):655-64.
140. Oliveira A.P., Ludwig C, Picotti P, Kogadeeva M, Aebersold R, Sauer U. Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Mol Syst Biol*. 2012. 8:623.
141. Ozaki Y., Suzuki T, Kuruma Y, Ueda T, Yoshida M. UncI protein can mediate ring-assembly of c-subunits of FoF1-ATP synthase in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008. 367(3):663-6.
142. Pallen M.J., Bailey CM, Beatson SA. Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases. *Protein Sci*. 2006. 15(4):935-41.
143. Pänke O., Gumbiowski K, Junge W, Engelbrecht S. F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EF(o)EF(1). *FEBS Lett*. 2000. 472(1):34-8.

144. Perzov N., Padler-Karavani V, Nelson H, Nelson N. Features of V-ATPases that distinguish them from F-ATPases. *FEBS Lett.* 2001. 504(3):223-8.
145. Procópio R.E., Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.* 2012. 16(5):466-71.
146. Rak M., Zeng X, Brière JJ, Tzagoloff A. Assembly of F₀ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 2009. 1793(1):108-16.
147. Rees D.M., A.G.W. Leslie, J.E. Walker, The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. 21597–21601
148. Reinders J., K. Wagner, R.P. Zahedi, D. Stojanovski, B. Eyrich, M. van der Laan, P. Rehling, A. Sickmann, N. Pfanner, C. Meisinger, Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase, *Mol. Cell. Proteomics.* 2007. 6: 1896–1906
149. Rfmires F., James F. Marecek, Shu-I Tu, Thomas V. Kantor, and Hiroshi Okazaki. Effects of Borohydride-Treated Oligomycins on Processes of Energy Transduction in Mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 1982. 121: 275-2279
150. Richter M.L., Hein R, Huchzermeyer B. Important subunit interactions in the chloroplast ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2000. 1458(2-3):326-42.
151. Robitaille A.M., Christen S, Shimobayashi M, Cornu M, Fava LL, Moes S, Prescianotto-Baschong C, Sauer U, Jenoe P, Hall MN. Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science.* 2013. 339(6125):1320-3.
152. Rodloff A., Bauer T, Ewig S, Kujath P, Müller E. Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action. *Dtsch Arztebl Int.* 2008. 105(39):657-62.
153. Saier M.H. Jr. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000. 64(2):354-411.

154. Saita E., Iino R, Suzuki T, Feniouk BA, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Activation and stiffness of the inhibited states of F₁-ATPase probed by single-molecule manipulation. *J Biol Chem.* 2010. 285(15):11411-7.
155. Sakthivel S. ATP-ase as a potential drug target for cancer, tumor growth and cellular functions. *Int J Hum Genet.* 2012. 12:151–156
156. Sambrook J., Fritsch, E.E., and Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Senior A.E. ATP synthase: motoring to the finish line. *Cell.* 2007. 130(2):220-1.
157. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing chain-terminating inhibitors. *Biotechnology.* 1992. V.24. P.104-108.
158. Sergeant N., Watzel A, Galván-valencia M, Ghestem A, David JP, Lemoine J, Sautié PE, Dachary J, Mazat JP, Michalski JC, Velours J, Mena-López R, Delacourte A. Association of ATP synthase alpha-chain with neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2003. 117(2):293-303.
159. Schägger H., Ohm TG. Human diseases with defects in oxidative phosphorylation. 2. F₁F₀ ATP-synthase defects in Alzheimer disease revealed by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Biochem.* 1995. 227(3):916-21.
160. Schenk P.W., Snaar-Jagalska BE. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1999. 1449(1):1-24.
161. Shchepina L.A., Pletjushkina OY, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Fetisova EK, Izyumov DS, Saprunova VB, Vyssokikh MY, Chernyak BV, Skulachev VP. Oligomycin, inhibitor of the F₀ part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene.* 2002. 21(53):8149-57.
162. Skulachev V. P. Membrane bioenergetics. Berlin, New York. 1988.
163. Smith J.B., Sternweis PC. Purification of membrane attachment and inhibitory subunits of the proton translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli.* *Biochemistry.* 1977. 16(2):306-11.

164. Smith R. M., Peterson, W. H. & McCoy, E. Oligomycin, a new antifungal antibiotic. *Antibiot. Chemother.* 1954. 4: 962–970
165. Sternweis P.C., Smith JB. Characterization of the inhibitory (epsilon) subunit of the proton-translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1980. 19(3):526-31.
166. Stock D., Leslie AG, Walker JE. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science.* 1999. 286(5445):1700-5.
167. Stock D., Gibbons C, Arechaga I, Leslie AG, Walker JE. The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol.* 2000. 10(6):672-9.
168. Symersky J., Pagadala, V., Osowski, D., Krah, A., Meier, T., Faraldo-Gomez, J.D., and Mueller, D.M. Structure of the c(10) ring of the yeast mitochondrial ATP synthase in the open conformation, *Nature Struct. Mol. Biol.* 2012. 19: 485–491.
169. Sumi M., Yohda M, Koga Y, Yoshida M. F₀F₁-ATPase genes from an archaeobacterium, *Methanosarcina barkeri*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. 241(2):427-33.
170. Suzuki T., Murakami T, Iino R, Suzuki J, Ono S, Shirakihara Y, Yoshida M. F₀F₁-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.* 2003. 278(47):46840-6.
171. Suzuki T., Ozaki Y, Sone N, Feniouk BA, Yoshida M. The product of *uncI* gene in F₁F_o-ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist c-ring assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104(52):20776-81.
172. Suzuki T., Wakabayashi C, Tanaka K, Feniouk BA, Yoshida M. Modulation of nucleotide specificity of thermophilic F_(o)F₍₁₎-ATP Synthase by epsilon-subunit. *J Biol Chem.* 2011. 286(19):16807-13.
173. Symersky J. Daniel Osowskia, D. Eric Waltersb, and David M. Muellera. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. Edited by Gottfried Schatz, University of Basel, Reinach, Switzerland, and approved. 2012.

174. Thaker Y.R., Roessle M, Grüber G. The boxing glove shape of subunit d of the yeast V-ATPase in solution and the importance of disulfide formation for folding of this protein. *J Bioenerg Biomembr.* 2007. 39(4):275-89.
175. Thompson J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*1994. 22: 4673–4680.
176. Thyagarajan D., Shanske S, Vazquez-Memije M, De Vivo D, DiMauro S. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol.* 1995. 38(3):468-72.
177. Tikhonov A.N., Pogrebnaia AF, Romanovskiĭ IuM. (Electrostatic interactions in catalytic centers of F1-ATPase). *Biofizika.* 2003. 48(6):1052-70.
178. Timm J., Post FA, Bekker LG, Walther GB, Wainwright HC, Manganeli R, Chan WT, Tsenova L, Gold B, Smith I, Kaplan G, McKinney JD. Differential expression of iron-, carbon-, and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(24):14321-6.
179. Tomashek J.J., Glagoleva OB, Brusilow WS. The *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase displays biphasic synthesis kinetics. *J Biol Chem.* 2004. 279(6):4465-70.
180. Ueno H., Suzuki T, Kinoshita K Jr, Yoshida M. ATP-driven stepwise rotation of FoF1-ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. 102(5):1333-8.
181. van der Laan M., Bechtluft P, Kol S, Nouwen N, Driessen AJ. F1F0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J Cell Biol.* 2004. 165(2):213-22.
182. von Ballmoos C., Dimroth P. Two distinct proton binding sites in the ATP synthase family. *Biochemistry.* 2007. 46(42):11800-9.
183. von Meyenburg K., Jørgensen BB, Nielsen J, Hansen FG. Promoters of the atp operon coding for the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* mapped by Tn10 insertion mutations. *Mol Gen Genet.* 1982. 188(2):240-8.

184. Vignais P.V., Satre M. Recent developments on structural and functional aspects of the F1 sector of H⁺-linked ATPases. *Mol Cell Biochem.* 1984. 60(1):33-71.
185. Wahl M.L., Kenan DJ, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *J Cell Biochem.* 2005. 96(2):242-61.
186. Walker J.E., Dickson VK. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2006. 1757(5-6):286-96.
187. Watanabe R., Noji H. Chemomechanical coupling mechanism of F(1)-ATPase: catalysis and torque generation. *FEBS Lett.* 2013587(8):1030-5.
188. Wayne L.G., Sohaskey CD. Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis. *Annu Rev Microbiol.* 2001. 55:139-63.
189. Wender P.A., Jankowski OD, Longcore, K, Tabet EA, Seto H, Tomikawa T. Correlation of F0F1-ATPase inhibition and antiproliferative activity of apoptolidin analogues. *Org Lett.* 2006. 8(4):589-592.
190. Wittig I., Schägger H. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2008. 1777(7-8):592-8.
191. Yang P.W. , Li MG Zhao JY et al. Oligomycin A and C, major secondary metabolites isolated from the newly isolated strain *Streptomyces diastaticus* Folia *Microbiol. The Journal of Antibiotics.* 1987. 40
192. Ysern X., Amzel LM, Pedersen PL. ATP synthases--structure of the F1-moiety and its relationship to function and mechanism. *J Bioenerg Biomembr.* 1988. 20(4):423-50.
193. Zhang F. X., Pan W., Hutchins J. B. Phosphorylation of F1F0 ATPase δ -subunit is regulated by platelet-derived growth factor in mouse cortical neurons in vitro. *J. Neurochem.* 1995. 65, 2812–2815
194. Zhang X., Gao F, Yu LL, Peng Y, Liu HH, Liu JY, Yin M, Ni J. Dual functions of a monoclonal antibody against cell surface F1F0 ATP synthase on both HUVEC and tumor cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2008. 29(8):942-50.

195. Zhao X., León IR, Bak S, Mogensen M, Wrzesinski K, Højlund K, Jensen ON. Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Mol Cell Proteomics*. 2011. 10(1):M110.000299.
196. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
197. WTFE. Oxidative phosphorylation:
https://en.wikipedia.org/wiki/Oxidative_phosphorylation

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Паспорт кластера генов F₀F₁-АТФ-синтазы *S. fradiae* ATCC 19609 и кодируемых ими белков

1. Локализация генов F₀F₁-АТФ-синтазы на хромосоме *S. fradiae* ATCC 19609:

Название гена и кодируемого им белка	Locus_tag	Позиции начала и конца в хромосоме
hypothetical protein SFRA_00840	SFRA_00840	198419 - 199066
protein tyrosine phosphatase	SFRA_00845	199063 - 199776
transferase	SFRA_00850	200207 - 201568
ATP synthase I	SFRA_00855	201884 - 202321
ATP synthase F0F1 subunit A	SFRA_00860	202586 - 203407
ATP synthase subunit C	SFRA_00865	203478 - 203702
ATP synthase F0F1 subunit B	SFRA_00870	203744 - 204301
ATP synthase F0F1 subunit delta	SFRA_00875	204298 - 205113
ATP synthase F0F1 subunit alpha	SFRA_00880	205233 - 206804
ATP synthase F0F1 subunit gamma	SFRA_00885	206807 - 207724
ATP F0F1 synthase subunit beta	SFRA_00890	207730 - 209184
ATP synthase subunit epsilon	SFRA_00895	209317 - 209694
hypothetical protein SFRA_00900	SFRA_00900	209820 - 210269
chitinase	SFRA_00905	210467 - 211732
hypothetical protein SFRA_00910	SFRA_00910	211970 - 212221
hypothetical protein SFRA_00915	SFRA_00915	212211 - 213491

2. Расположение в кластере: Гены F₀F₁-АТФ-синтазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609 находятся в одном кластере с генами тирозиновой фосфатазы и трансферазы (со стороны 5'-конца хромосомы), за кластером расположены ген секретируемого белка и хитиназы.

3. Межгенное пространство: Межгенное пространство для *atpB* составляет 264 нуклеотидов, для *atpE* - 70 нуклеотидов, для *atpF* - 41 нуклеотид, ген *atpH* перекрывается с геном *atpF* (область перекрывания – 4 нуклеотида), межгенное пространство для *atpA* составляет 119 нуклеотидов, для *atpG* - 2 нуклеотида, для *atpD* - 5 нуклеотидов, для *atpC* - 132 нуклеотида.

4. Предсказанный промотор: Гены, кодирующие субъединицы а, с, b, δ, α, γ, β и ε, находятся под общим промотором типа A, D ([Bourn W.R. et al., 1995](#)).

CGACCGGGGGCGCGTCAAGAACCCGTAAGCGGGCCTGCTATCGTCCGGTTCCAACCTGCGGCACAGCGCGA
GCGGTCGGCCGGGCTCCCGGATTCACGGGACGGAACCGGCGGTCCCCGCGGCTGACGCCCCGTCGGCCA
CACGGCTCCGCGCCGGCCGGCCGCCCCCAAACCCGTAACACCAGTCCAGTGCCGAACCGCGGCTCCGTGC
CGCGCCGACACAACGAGGTTGCCGTACCTATGCGCCACGCTGAAGGAGCTCGCGGTTG

A D

ATP synthase F₀F₁ subunit A

1. Название гена: *atpB*

2. Номер последовательности в GenBank: KDS89924, SFRA_00860

3. Нуклеотидная последовательность: 822 п.н.

```

1  gtgagtgtctg  acccgacaac  ggtgctcgcg  ttcgagaccg  attgccacat  cttctccggg
61  tgcggcttcc  cggcccccag  cctgtggtct  ttcattcttcg  acccgatcgc  cggagacgcg
121 gactccacct  tctacttcaa  caagccgatg  ctgctggcgc  tgctcagcac  cattgtggtc
181 gtcggcttct  tctggatggc  gttcgcgaag  ccgaaggctc  tgcccggcaa  gctccagatg
241 gtcggcgaag  ccggcctgga  cttcgtccgc  aacggcatcg  tctaccagac  gatgggcaag
301 aaggacggcg  agaagtacgt  cccgctcatg  gtctcgctgt  tcttcttcgt  atggatcatg
361 aacctctggt  ccatcatccc  gctggcccag  ttcccgggta  cctcgatcat  cgcgatccg
421 gccgcccctg  cggcgatcgt  ctacatcctc  tgggtctcgc  tgaccttcaa  gaagcacggc
481 ttcgtcggct  tcttcaagaa  cgtcaccggc  tacgacaagt  cgctgggcgc  cgtgctgccg
541 ctggccatga  ccatcgagtt  cttctcgaac  ctgctggtcc  gcccgttcac  gcacgcggtc
601 cggctcttcg  cgaacatggt  cgccggtcac  accctgctgg  tgctcttcac  catcgccagc
661 tggtacctgc  tgaacgggat  cggcatcgcc  tacgcccggg  tctcgttcgt  gatggttctc
721 gtgatgaccg  tcttcgagct  cttcatccag  gccgttcagg  catacgtctt  cgtcctgctg
781 gcctgcacct  acgtccaggg  cgctctcgca  gagcaccact  ga

```

4. Название белка: ATP synthase F₀F₁ subunit A

5. Протяженность в аминокислотах, молекулярная масса: 273 а/к, 30,230 кДа

6. Аминокислотная последовательность:

```

1  MSADPTTVLA  FETDCHIFSG  CGFPAPSLWS  FIFDPIAGDA  DSTFYFNKPM  LLALLSTIVV
61  VGFFWMAFAK  PKVVPKQLQM  VGEAGLDFVR  NGIVYQTMGK  KDGEKYVPLM  VSLFFFVWIM
121 NLWSIIPLAQ  FVPTSIIAYP  AALAAIVYIL  WWSLTFKKHG  FVGFFKNVTG  YDKSLGAVLP
181 LAMTIEFFSN  LLVRPFTHAV  RLFANMFAGH  TLLVLFTHAS  WYLLNGIGIA  YAGVSFVMVL
241 VMTVFELFIQ  AVQAYVFVLL  ACTYVQGALA  EHH

```

7. Изоэлектрическая точка pI: 7,00**8. Доменная структура белка:**

Регион " F₀F₁ ATP synthase subunit A; Validated " – 43 - 273 а/к

9. Возможные молекулярные функции белка:

протон-транспортная активность АТФ-синтазы, механизм вращения

10. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1 с вероятностью более 70% -

T₄₃-70,5%; Y₄₅-84,9%; T₉₇-81,2%; Y₁₀₆-91,7%; T₁₅₅-93,1%

11. Гомология с подобными белками у других видов *Streptomyces*:

№	Название белка	Вид <i>Streptomyces</i>	% идентичности	% сходства	Ссылка на NCBI
1	ATP synthase F0 subunit A	<i>S. albus</i>	96	98	WP_078843634.1
2	ATP synthase F0 subunit A	<i>S. xinghaiensis</i>	96	97	WP_039822271.1
3	ATP synthase F0 subunit A	<i>Streptomyces sp. Ru87</i>	92	97	PGH48299.1
4	ATP synthase F0 subunit A	<i>S. violaceorubidus</i>	85	93	WP_030187257.1
5	ATP synthase subunit a	<i>S. ambofaciens</i>	85	93	AKZ58158.1
6	ATP synthase F0 subunit A	<i>S. cellulosa</i>	84	93	WP_030672354.1
7	ATP synthase F0F1 subunit A	<i>S. antibioticus</i>	85	92	OOQ48538.1

12. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой:

отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
27,9	211 а/а	Autoinhibited <i>E. coli</i> atp synthase	<i>Escherichia coli</i>	5t4o, 5t4p, 5t4q
25,2	217 а/а	Bovine mitochondrial atp synthase	<i>Bos taurus</i>	5ara, 5are, 5arh, 5ari
29,9	122 а/а	Structure of f-atpase from <i>pichia angusta</i>	<i>Ogataea angusta</i>	5lqx, 5lqy, 5lqz

ATP synthase subunit C

1. Название гена: *atpE*

2. Номер последовательности в GenBank: KDS89925, SFRA_00865

3. Нуклеотидная последовательность: 225 п.н.

```

1 atgtcccaga cccttgctgc cgtcgaaggt tcctcagct ccgtcggcta cggcctggcg
61 gccatcggcc cggcgtcgg cgtcggcatc atcttcggta acggcaccca ggcctcggc
121 cgtcagcccg aggcggccgg tctcatcgc gccaacca tctcggctt cgcgttctgt
181 gaagcgtg cctcatcgg cctcgtcatg ccgttcgttt actaa

```

4. Название белка: ATP synthase subunit C

5. Протяженность в аминокислотах, молекулярная масса: 74 а/к, 7,411 кДа

6. Аминокислотная последовательность:

```

1 MSQTLAAVEG SLSSVGYGLA AIGPGVGVGI IFGNGTQALA RQPEAAGLIR ANQILGFAFC
61 EALALIGLVM PFVY

```

7. Изоэлектрическая точка pI: 4,78

8. Доменная структура белка:

Регион " ATP synthase subunit C; cl00466" – 10 - 74 а/к

9. Возможные молекулярные функции белка:

связывание липидов; протон-транспортная активность АТФ-синтазы, механизм вращения

10. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1 с вероятностью более 70% -

Отсутствуют

11. Гомология с подобными белками у других видов *Streptomyces*:

№	Название белка	Вид <i>Streptomyces</i>	% идентичности	% сходства	Ссылка на NCBI
1	ATP synthase subunit c	<i>S. ambofaciens</i>	100	100	AKZ58159.1
2	ATP synthase F0 subunit C	<i>S. parvulus</i>	100	100	ANJ09529.1
3	ATP synthase F0 subunit C	<i>S. subutilus</i>	100	100	OEJ33753.1
4	C subunit	<i>S. coelicoflavus</i>	99	100	EHN80022.1
5	ATP synthase F0 subunit C	<i>S. jietaisiensis</i>	97	100	SDE83205.1
6	ATP synthase F0 subunit C	<i>S. malaysiense</i>	99	98	OIK27625.1
7	F0F1 ATP synthase subunit C	<i>S. atratus</i>	97	98	SFX25548.1

12. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой: отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
47,0	66 а/а	Atp synthase subunit c, chloroplastic.	<i>Triticum aestivum</i>	4mjn
47,0	66 а/а	Atp synthasE C chain, chloroplastic	<i>Spinacia oleracea</i>	2w5j
37,1	62 а/а	Atp synthasE C chain	<i>Bacillus sp. Ps3</i>	1wu0

ATP synthase F₀F₁ subunit B

1. Название гена: *atpF*

2. Номер последовательности в GenBank: KDS89926, SFRA_00870

3. Нуклеотидная последовательность: 558 п.н.

```

1 gtgaacgttc tggttcacct ggcggcggag gagcctcaga atcctctgat cccgccgatc
61 ccagagctcg tcatcggcct gatcgcgttc gccatcgtct tcggcgctct cgccaagaag
121 ctctccccga acatcaacaa ggttctggaa gacgcgcgcg aggccatcga aggcggcatc
181 gagaaggccg aggcggccsa gaccgagggc caggacgtgc tggagcagta caaggcccag
241 ctgcscgaag cccggcacga ggcggcgcgg ctgcgccagg aggccccagga gcagggcgcc
301 gcgctcatcg ccgagatgcg cgcggagggc cagcggcagc gcgaggagat catcgccgcc
361 ggtcacaccs agatcgaggc cgaccgcaag caggccgcgc aggcgctgcg ccaggacgtg
421 ggcacgctcg ccacgacct ggccggcaag ctcgtcggcg agtccctcga ggaccacgcc
481 cggcagagcc gcgtcatcga ccgcttctcg gacgagctgg agaccaaggc ggcgacgaag
541 gccgaggccg gccgatga

```

4. Название белка: ATP synthase F₀F₁ subunit B

5. Протяженность в аминокислотах, молекулярная масса: 185 а/к, 20,234 кДа

6. Аминокислотная последовательность:

```

1 MNVLVHLLAAE EPQNPLIPPI PELVIGLIAF AIVFGVLAKK LLPNINKVLE ERREAIEGGI
61 EKAEEAAQTEA QDVLEQYKAQ LAEARHEAAR LRQEAQEQGA ALIAEMRAEG QRQREEIIAA
121 GHTQIEADRK QAAQALRQDV GTLATTLAGK LVGESLEDHA RQSRVIDRFL DELETKAATK
181 AEAGR

```

7. Изоэлектрическая точка pI: 5,16

8. Доменная структура белка:

Регион " ATP-synt_B " – 16 - 176 а/к

9. Возможные молекулярные функции белка:

протон-транспортная активность АТФ-синтазы, механизм вращения

10. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1 с вероятностью более 70% -

T₆₈-73,4%; T₁₄₅-76,3%; S₁₅₅-99,6%; S₁₆₃-88,0%; T₁₇₅-71,6%

11. Гомология с подобными генами других видов и родов актинобактерий:

№	Название белка	Вид <i>Streptomyces</i>	% идентичности	% сходства	Ссылка на NCBI
1	F0F1 ATP synthase subunit B	<i>S. xinghaiensis</i>	99	99	WP_019710009.1
2	F0F1 ATP synthase subunit B	<i>S. albus</i>	98	99	WP_030545780.1
3	F0F1 ATP synthase subunit B	<i>Streptomyces sp. Ru87</i>	90	94	WP_098753916.1
4	ATP synthase F0 subcomplex B subunit	<i>S. misionensis</i>	91	93	SED61375.1
5	F0F1 ATP synthase subunit B	<i>S. hyaluromycini</i>	91	93	WP_089098758.1
6	F0F1 ATP synthase subunit B	<i>S. griseochromogenes</i>	91	93	ANP49462.1
7	F0F1 ATP synthase subunit B	<i>S. humi</i>	90	93	WP_046730641.1
8	H(+)-transporting two-sector ATPase chain b protein	<i>S. ghanaensis</i>	89	94	EFE67063.1
9	F0F1 ATP synthase subunit B	<i>S. luteus</i>	88	92	KFG73674.1
10	F0F1 ATP synthase subunit B	<i>S. coelicolor</i>	88	91	NP_629508.1
		<i>S. lividans</i>			AIJ13323.1

12. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой:

отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
31,3	147 a/a	Autoinhibited E. coli atp synthase	<i>Escherichia coli</i>	5t4o, 5t4p, 5t4q
33,9	59 a/a	Atp synthase b chain	<i>Escherichia coli</i>	1l2p

АТФ synthase F₀F₁ subunit delta

1. Название гена: *atpH*

2. Номер последовательности в GenBank: KDS89927, SFRA_00875

3. Нуклеотидная последовательность: 816 п.н.

```

1 atgaacggag cgaacccgca ggcactggct gccgcacgcg agcgtctcga cgcgctcacg
61 gacaacacgt ccgtggacgc ggcgaagctc gccgaggagc tggccgcccgt cacgggcctg
121 ctcgaccgcg aggtgtcgct gcgtcggggtc ctcaccgacc cggcgcaggc cggcgaggcc
181 aaggccgaac tggccggggcg cctgctggcg ggccaggctcg gcggcgagac cgccgacctc
241 gtcaccggca tggtcgctc ccgctggctg cgctcgcgcy acctggtgga cgcgatcgag
301 gagctggcga gcaccgccga gctcatcgcc gcgcagcggg ccggtgcygct ggacgacgtg
361 gaggacgagc tgttccgggt cggccggatc gtcgcctcca gccccgagct gcgcgcygga
421 ctcgccgagc gcggcaccga ggccgcyggcc aaggccgagt tgctccgccc gctgctggga
481 ggccggggca acccggtcac cgaacggctg gtgacgcyac tcgtgacgcy gcccgcygga
541 cgtagcctgg acggtgggct ggacgcygct tccaagctgg ccgcygaccg ccgtgaccgc
601 ctggtcgcg cytcaccte ggcyggtgcy ctcagcgcg agcagaagcy gcgtctcggc
661 gacgggctgg cccggctgta cggccggcag atgcatctga acctcgcgcy ggaccccgcy
721 gtcctcggcy ggatccaggt gcggatcggc gacgaggtca tcaacggcac catcgcccgc
781 cgcctcgcg aggtgtcccg gcggatggcc ggctga

```

4. Название белка: ATP synthase F₀F₁ subunit delta

5. Протяженность в аминокислотах, молекулярная масса: 271 а/к, 28,944 кДа

6. Аминокислотная последовательность:

```

1 MNGASREALA AARERLDALT DNTSVDAAKL AEELAAVTGL LDREVSLRRV LTDPAQAGEA
61 KAELAGRLLA GQVGGETADL VTGMVRSRWS RSRDLVDAIE ELASTAELIA AQRSGALDDV
121 EDELFRFGRI VASSPELRAA LAERGTEAAA KAELLRRLG GRANPVTERL VTRLVTRPRG
181 RSLDGGLDAL SKLAADRRDR LVAVVTSAVP LSDEQKRLG DGLARLYGRQ MHLNLDVDPG
241 VLGGIQVRIG DEVINGTIAD RLDEVSRMA G

```

7. Изоэлектрическая точка pI: 5,54

8. Доменная структура белка:

Регион " F₀F₁ ATP synthase subunit delta; Provisional" – 1 - 271 а/к

9. Возможные молекулярные функции белка:

протон-транспортная активность АТФ-синтазы, механизм вращения

10. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1 с вероятностью более 70% -

T₂₃-83,3%; S₄₆-91,5%; S₉₀-99,0%; S₁₀₄-90,5%; S₁₃₃-82,0%; S₁₃₄-98,7%; S₁₈₂-98,0%; S₂₁₂-98,3%; S₂₆₆-94,3%

11. Гомология с подобными генами других видов и родов актинобактерий:

№	Название белка	Вид <i>Streptomyces</i>	% идентичности	% сходства	Ссылка на NCBI
1	F0F1 ATP synthase subunit delta	<i>S. xinghaiensis</i>	98	99	WP_019710008.1
2	F0F1 ATP synthase subunit delta	<i>S. albus</i>	98	98	WP_030545778.1
3	F0F1 ATP synthase subunit delta	<i>Streptomyces sp. Ru87</i>	84	92	PGH48302.1
4	F0F1 ATP synthase subunit delta	<i>S. ochraceiscleroticus</i>	84	91	WP_031051821.1
5	F0F1 ATP synthase subunit delta	<i>S. rubrolavendulae</i>	83	91	AOT61084.1
6	F0F1 ATP synthase subunit delta	<i>S. thermolilacinus</i>	82	91	OEJ94384.1
7	ATP synthase F0F1 subunit delta	<i>S. europaeiscabiei</i>	80	90	KND29849.1

12. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой: отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
28,0	161 a/a	Bovine mitochondrial atp synthase	<i>Bos taurus</i>	5ara, 5are, 5arh, 5ari
25,7	105 a/a	Autoinhibited E. coli atp synthase	<i>Escherichia coli</i>	5t4o, 5t4p, 5t4q

ATP synthase F₀F₁ subunit alpha**1. Название гена:** *atpA***2. Номер последовательности в GenBank:** KDS89928, SFRA_00880**3. Нуклеотидная последовательность:** 1572 п.н.

1 atggcggagc tcacgatccg gccggaggag atccgggacg cgctggagaa ctttgtccag
 61 gcgtacaagc cggacgcggc ctgcgcgag gaggtcggta cggtaagcgt tgccggcgac
 121 ggcacgcgca aggtcgaggg tctgccctcg gccatggcga acgagctgct caggttcgag
 181 gacggcacc cgggtctcgc cctcaacctg gaagagcgcg agatcggcgc gatcgttctc
 241 ggcgagttca gcggcatcga ggagggccag ccggtgcagc gcaccggtga ggtgctctcc
 301 gtcgcggtcg gcgagggcta cctcggccgc gtcgtogacc cgctgggcaa cccgatcgac
 361 ggcctcggcg agatcgcgac cgagggccgc cgcgccctcg agctgcaggc ccccggcgct
 421 atggcgcgca agtcgggtgca cgagccgatg gagaccggcc tcaaggccgt cgacgcgatg
 481 accccgatcg gccgcggcca gcgtcagctg atcatcggcg accgccagac cggcaagacc
 541 gcgctggccg tcgacacgat catcaaccag cgcgacaact ggcgctcggg cgaccggac
 601 aagcaggtcc gctgcatcta cgtcgcgctc gcccagaagg gctccaccat cgcgtccgty
 661 cgcggcgcgc tggaggaggc cgggtgccctg gagtacacga cgatcgtcgc ggccccggcg
 721 tccgaccggc ccggcttcaa gtacctcgcc ccgtacaccg gctcggccat cgggcagcac
 781 tggatgtacc agggcaagca cgtcctgatc gtcttcgacg acctgtcaa gcaggccgac
 841 gcctaccgcy ccgtctccct gctgctgcy cgcgcccgcy gccgtgaggc ctaccgggt
 901 gacgtcttct acctgcactc cgggtgctg gagcgtgcy ccaagctctc cgacgagctg
 961 ggcaagggtc cgatgacggg tctcccgatc gtcgagacca aggcgaacga cgtctcggcy
 1021 ttcacccgca ccaacgtcat ctccatcacc gacggccagt gcttctgga gtccgacctc
 1081 ttcaacgcgy gccagcggcc ggcgctgaac gtcggtatct cggctctccg tgcggtggc
 1141 tccgcccagc acaaggccat gcgycaggtc tccggccgcy tccgctgga cctcgcacc
 1201 taccgcgagc tggaggcgtt cgcgccttc ggttccgacc tggacgcgcy ctccaaggcc
 1261 tcgctggagc gcggcaagcy catggtgga ctgctgaagc agggccagta cgcgccgttc
 1321 tccacggaga accaggtcgt ctccatctgy gccggacca ccggcaagat ggacgatgty
 1381 cccgtcaggy acatccgccc cttcgagagc gagctgctgy actacctcca ccgcgagcac
 1441 aagggcctga tgacgagcat ccgcgagggc gccaaagtgt cggacgacac cctgcaggcy
 1501 ctgcgccagc ccatcgcctc cttcaagcgy cagttcgaga cctcggacgy caagctgctg
 1561 ggtgagggt ga

4. Название белка: ATP synthase F₀F₁ subunit alpha**5. Протяженность в аминокислотах, молекулярная масса:** 523 а/к, 56,494 кДа

6. Аминокислотная последовательность:

1 MAELTIRPEE IRDALENFVQ AYKPDAASRE EVGTVSVAGD GIAKVEGLPS AMANELLRFE
 61 DGTLLGLALNL EEREIGAIVL GEFSGIEEGQ PVQRTGEVLS VAVGEGYLGR VVDPLGNPID
 121 GLGEIATEGR RALELQAPGV MARKSVHEPM ETGLKAVDAM TPIGRGQRQL IIGDRQTGKT
 181 ALAVDTIINQ RDNWRSGDPD KQVRCIYVAV GQKGSTIASV RGALEEAGAL EYTTIVAAPA
 241 SDPAGFKYLA PYTGSAIGQH WMYQGKHVLI VFDDLKQAD AYRAVSLLLR RPPGREAYPG
 301 DVFYLHSRLL ERCAKLSDEL GKGSMTGLPI VETKANDVSA FIPTNVISIT DGQCFLES DL
 361 FNAGQRPALN VGISVSRVGG SAQHKAMRQV SGRLRVDLAQ YRELEAFAAF GSDLDAASKA
 421 SLERGKRMVE LLKQGQYAPF STENQVVSIV AGTTGKMDDV PVEDIRRFES ELLDYLHREH
 481 KGLMTSIREG AKMSDDTLQA LADAIASFKR QFETS DGKLL GEG

7. Изоэлектрическая точка pI: 5,12**8. Доменная структура белка:**

Регион " F₀F₁ ATP synthase subunit alpha; Validated " – 4 - 514 а/к;

Регион " ATP-synt_ab_N " – 30 - 96 а/к;

Регион " F1_ATPase_alpha " – 98 - 379 а/к;

Регион " ATP-synt_ab_C " – 388 - 481 а/к;

Сайт " Walker A motif " – 173 - 180 а/к;

Сайт " Walker B motif " – 269 - 273 а/к;

Сайты взаимодействия с субъединицей бета (полипептидное связывание) –

119-120,136-137,139-140,143,145,175-176,213-216,218-219,222,283-284,290-292,294-295,300,304,307,311,348,351,362-363,366,377 а/к;

АТФ-связывающие сайты (химическое связывание) –

175,179-181,207,212,273-274,277,332,348,361,366-367, 377 а/к

9. Возможные молекулярные функции белка:

АТФ-связывание, протон-транспортирующая активность АТФ-синтазы, механизм вращения, гидролиз АТФ

10. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1 с вероятностью более 70% -

T₅-98,4%; S₂₈-99,3%; S₁₄₅-99,5%; T₁₇₇-95,2%; S₂₁₅-78,0%; S₂₁₉-82,2%; S₃₁₇-96,2%; S₃₄₈-87,7%; S₃₉₁-91,5%; S₄₂₁-99,4%; S₄₄₁-98,8%; T₄₅₃-70,7%; T₄₅₄-92,7%; T₄₈₅-74,7%; S₄₈₆-98,3%;

S₅₀₇-92,6 %; S₅₁₅-85,3%

11. Гомология с подобными генами других видов и родов актинобактерий:

№	Название белка	Вид <i>Streptomyces</i>	% идентичности	% сходства	Ссылка на NCBI
1	F0F1 ATP synthase subunit alpha	<i>S. xinghaiensis</i>	99	99	WP_019710007.1
2	F0F1 ATP synthase subunit alpha	<i>S. albus</i>	99	99	WP_030545776.1
3	F0F1 ATP synthase subunit alpha	<i>S. pathocidini</i>	97	98	WP_055471366.1
4	F0F1 ATP synthase subunit alpha	<i>S. cinnamoneus</i>	96	98	WP_071964960.1
5	ATP synthase F0F1 subunit alpha	<i>S. eurocidicus</i>	95	98	PNE31188.1
6	ATP synthase F0F1 subunit alpha	<i>S. albireticuli</i>	95	98	ARZ67858.1
7	F0F1 ATP synthase subunit alpha	<i>S. alboverticillatus</i>	96	97	WP_086573268.1
8	F0F1 ATP synthase subunit alpha	<i>S. roseoverticillatus</i>	95	97	WP_030368001.1
9	F0F1 ATP synthase subunit alpha	<i>S. albulus</i>	95	97	OAL12426.1
10	F0F1 ATP synthase subunit alpha	<i>S. mobaraensis</i>	94	97	EME97108.1

12. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой:
отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
62,0	482 a/a	Crystal structure of the f1-atpase from the thermoalkaliphilic bacterium	<i>Bacillus sp.</i>	2qe7
55,8	484 a/a	Atp synthase subunit alpha heart isoform, mitochondrial	<i>Bos taurus</i>	2w6e, 2w6f, 2w6q, 2w6h
54,2	504 a/a	Bovine mitochondrial atp synthase	<i>Bos taurus</i>	5ara, 5are, 5arh, 5ari

ATP synthase F₀F₁ subunit gamma**1. Название гена:** *atpG***2. Номер последовательности в GenBank:** KDS89929, SFRA_00885**3. Нуклеотидная последовательность:** 918 п.н.

1 atgggtgccc agatccgggt ctacaagcgc cgtatcaagt cggtcaccgc gacgaagaag
 61 atcaccaagg cgatggagat gatcgcggcc tcgcgcatca tcaaggccca gcgccagggtg
 121 gaggcctctt cgccgtacgc gcgggagctc acccgcgcgg tggcggcggt ggccaccggc
 181 tcgaacaccc agcaccscgt gaccaccgag accgagcggc ccgtccgggc cgcggtcctg
 241 ctcgtcacga gcgaccgcgg actcgcggc ggctactcct ccaacgccat caaggcggcg
 301 gagacgctcc gggagaagct cgtcgcggag ggcaaggagg tcgtccagta cgtcgtcggc
 361 cgtaagggcg tggcctacta cacgttccgg gagcgggaagc tcgcggactc gtggaccggc
 421 ttcaccgaca gcccgtcgta cgcggacgcc aaggccgctc cggccccgct gatcgaggcg
 481 gccgtccagg acaccgccga gggcggcggtg gacgaactgc acatcgtctt cacggagtcc
 541 gtgtcgatga tgacgcagtc gccggtcgag aagcggctgc tgccgctcag cctcgccgag
 601 gcgggtgctg tggagcaggg ctcgaaggcg gagatccttc cgctgttcga cttcgagccc
 661 tccgccgagg aagtcctcga cgccctgctg ccgcggtacg tcgagagccg catcttcaac
 721 gccctgctgc agtcggccgc ctccgagcac gccccccgcc gccgcgcgat gaagtcggcc
 781 accgacaacg ccgaagagct catcaagtcg ctgacgcggc ttgccaacgc ggcccgcag
 841 gccgacatca cccaggaat cagcgagatc gtcggtgggc ctggcgcctt ggccgacgcg
 901 aacgcgggga gtgactga

4. Название белка: ATP synthase F₀F₁ subunit gamma**5. Протяженность в аминокислотах, молекулярная масса:** 305 а/к, 32,754 кДа**6. Аминокислотная последовательность:**

1 MGAQIRVYKR RIKSVTATKK ITKAMEMIAA SRIIKAQRQV EASSPYAREL TRAVAAVATG
 61 SNTQHPLTTE TERPVRAAVL LVTSDRGLAG GYSSNAIKAA ETLREKLVAE GKEVVQYVVG
 121 RKGVAYYTFR ERKLADSWTG FTDSPSYADA KAVAAPLIEA AVQDTAEGGV DELHIVFTEF
 181 VSMMTQSPVE KRLPLSLAE AGAVEQGSKA EILPLDFEPE SAEVLDALL PRYVESRIFN
 241 ALLQSAASEH AARRRAMKSA TDNAEELIKS LTRLANAARQ ADITQEISEI VGGAGALADA
 301 NAGSD

7. Изоэлектрическая точка pI: 6,39**8. Доменная структура белка:**Регион " F₀F₁ ATP synthase subunit gamma; Validated " – 2 - 297 а/к;

Сайты взаимодействия с основными доменами (полипептидное связывание) –

6, 11, 17, 21, 24-25, 27-28, 31-32, 86, 88-91, 121-122, 125-126, 129, 260, 263-264, 267, 273, 276-277, 279-280, 283-284, 287, 289-294 а/к;

Сайты взаимодействия с субъединицей дельта (полипептидное связывание) – 42-43, 45-46, 49, 52-53, 225, 228-229, 232 а/к;

Сайты взаимодействия с субъединицей эpsilon (полипептидное связывание) – 124, 135-140, 228, 231-232 а/к

9. Возможные молекулярные функции белка:

АТФ-связывание, протон-транспортирующая активность АТФ-синтазы, механизм вращения, гидролиз АТФ

10. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1 с вероятностью более 70% -

S₁₄-99,5%; T₁₆-74,8%; T₁₈-92,9%; S₄₄-97,5%; T₅₁-81,7%; S₆₁-81,1%; T₆₉-82,0%; T₇₁-95,3%; T₁₀₂-98,6%; T₁₂₈-89,6%; S₁₃₇-98,8%; S₁₄₄-97,2%; S₁₄₆-99,5%; Y₁₄₇-98,2%; S₁₈₇-93,8%;

S₁₉₇-88,6 %; S₂₀₈-79,1%; S₂₂₁-95,2%; S₂₄₈-96,6%; S₂₅₉-99,3%

11. Гомология с подобными генами других видов и родов актинобактерий:

№	Название белка	Вид <i>Streptomyces</i>	% идентичности	% сходства	Ссылка на NCBI
1	F0F1 ATP synthase subunit gamma	<i>S. xinghaiensis</i>	99	99	WP_019710006.1
2	F0F1 ATP synthase subunit gamma	<i>S. albus</i>	99	99	WP_030545774.1
3	F0F1 ATP synthase subunit gamma	<i>S. radiopugnans</i>	85	92	SEQ71351.1
4	F0F1 ATP synthase subunit gamma	<i>S. niger</i>	84	91	WP_052865126.1
5	F0F1 ATP synthase subunit gamma	<i>Streptomyces sp. Ru87</i>	84	89	PGH48304.1
6	ATP synthase F0F1 subunit gamma	<i>S. caatingaensis</i>	83	91	KNB50418.1
7	F0F1 ATP synthase subunit gamma	<i>S. sclerotialis</i>	83	90	WP_030621203.1
8	F0F1 ATP synthase subunit gamma	<i>S. albulus</i>	83	90	OAL12425.1
9	F0F1 ATP synthase subunit gamma	<i>S. cinnamoneus</i>	84	89	PHQ49211.1

12. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой:

отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
40,9	296 а/а	Atp synthase	<i>Caldalkalibacillus thermarum</i>	5hkk
37,3	287 а/а	Autoinhibited E. coli atp synthase	<i>Escherichia coli</i>	5t4o, 5t4p, 5t4q

ATP F₀F₁ synthase subunit beta

1. Название гена: *atpD*

2. Номер последовательности в GenBank: KDS89930, SFRA_00890

3. Нуклеотидная последовательность: 1455 п.н.

```

1 atgaccacca ctgttgagcc gaccgctccg gtcggcgtgg ccgcccggccg cgtcgcacgg
61 gtcacatcggcc cggtcgctcga cgtggagttc cccgctcgacg cgatgccgga gatctacaac
121 gccctgaccg tccaggctcgc ggaccocggcc caggacggcg ccgtcaagac gctgaccctc
181 gaggtcgcgcc agcacctggg tgaaggcgtg atccgcgcca tctccatgca gccacggac
241 ggtctcgtcc gccgggcccc cgtgaccgac accggcaagg gcatcacctg cccggtcggc
301 gacgtcacca agggccgggt gttcaacacc ctcggcgaga tcctgaacga gccggaggcc
361 gagtccgagg tcaccgagcg ctggccgatc caccgccagg ccccccctt cgaccagctc
421 gagtccaaga ccgagatggt cgagaccggc ctgaaggctg tcgacctgct gaccccgtac
481 gtcaagggcg gcaagatcgg tctgttcggg ggcgccggcg tcggcaagac cgtgctcatc
541 caggaaatga tcatgcgtgt ggccaagctg cacgagggcg tttccgtggt cgccgggtgc
601 ggcgagcgca cccgtgaggg caacgacctg atcgaggaga tggccgagtc cggcgttctc
661 ccgcagaccg ccctcgtctt cggccagatg gacgagcccc cgggcacccg tctccgggtc
721 gcgctggccg gtctgaccat ggcggagtac ttccgcgatg tgcagaagca ggacgtgctg
781 ttcttcatcg acaacatctt ccgcttcacc caggccgggt ccgaggctct cacgctgctc
841 ggccggatgc cctccgcggg gggctaccag ccgaacctcg cggacgagat gggcctcctc
901 caggagcgca tcacctcgac ccgcggtcac tcgatcacct ccatgcaggc gatctacgtg
961 cccgcgagcg acctgaccga cccggccccg gcgacgacct tcgcgcacct cgacgcgacg
1021 acggtcctct cccggccgat ctcggagaag ggcactacc cggcggtgga cccgctggac
1081 tcgacgtccc gcatcctgga cccgcgctac atctcgcagg agcactacga ctgcgcctcc
1141 cgcgtcaagg ggatcctgca gaagtacaag gacctccagg acatcatcgc cattctcggg
1201 atcgacgagc tcggcgagga ggacaagctg gtcgtccacc gcgcccgcg tatcgagcgc
1261 ttctgtcgc agaacaccca cgcggcgaag cagttcaccg gtctcgacgg atcggacgtt
1321 ccgctggacg agtcgatcgc cgcgttcaac gcgatcgccg acggcgagta cgaccacttc
1381 cccgagcagg cgttcttcat gtgcggtggc ctggacgacc tgaaggccaa ggccaaggag
1441 ctgggcatct cctga

```

4. Название белка: ATP F₀F₁ synthase subunit beta

5. Протяженность в аминокислотах, молекулярная масса: 484 а/к, 52,477 кДа

6. Аминокислотная последовательность:

1 MTTTVEPTAP VGVAAGRVAR VIGPVVDVEF PVDAMPEIYN ALTVQVADPA QDGAVKTLTL
 61 EVAQHLGEGV IRAISMQPTD GLVRRAPVTD TGKGITVPVG DVTKGRVFNT LGEILNEPEA
 121 ESEVTERWPI HRQAPAFDQL ESKTEMFETG LKVVDLLTPY VKGGKIGLFG GAGVGKTVLI
 181 QEMIMRVAKL HEGVSVFAGV GERTREGNDL IEEMAESGVL PQTALVFGQM DEPPGTRLRV
 241 ALAGLTMAEY FRDVQKQDVL FFIDNIFRFT QAGSEVSTLL GRMPSAVGYQ PNLADEMGLL
 301 QERITSTRGH SITSMQAIYV PADDLTD PAP ATTF AHL DAT TVLSRPISEK GIYP AV DPLD
 361 STSRILDPRY ISQEHYDCAS RVKGI LQKYK DLQDI IAILG IDELGEEDKL VVHRARRIER
 421 FLSQNTAAK QFTGLDGS DV PLDESIAAFN AIADGEYDHF PEQAFFMCGG LDDLKAKAKE
 481 LGIS

7. Изоэлектрическая точка pI: 4,79**8. Доменная структура белка:**

Регион " F₀F₁ ATP synthase subunit beta; Validated " – 16 - 482 а/к;

Регион " ATP-synt_ab_N " – 18 - 92 а/к;

Регион " F1-ATPase_beta " – 95 - 368 а/к;

Регион " ATP-synt_ab_C " – 376 - 482 а/к;

Сайт " Walker A motif " – 171 - 177 а/к;

Сайт " Walker B motif " – 260 - 264 а/к;

Сайты взаимодействия с субъединицей альфа (полипептидное связывание) –

117,135,137-138,140,142,203-205,208,230-232,237,268,271,275,281-283,285-286,291,295,302,319,322-323,327,334,336-338,349-350,359-360,362,364 а/к;

АТФ-связывающие сайты (химическое связывание) –

173,176-178,202-203,206,264,268,352-353 а/к;

Сайты связывания с ингибиторами – 350,352,358-359 а/к

9. Возможные молекулярные функции белка:

АТФ-связывание, протон-транспортирующая активность АТФ-синтазы, механизм вращения, гидролиз АТФ

10. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1 с вероятностью более 70% -

T₃-92,0%; T₄-93,3%; S₇₅-95,6%; T₉₁-83,6%; S₁₂₂-72,5%; T₁₂₅-92,0%; S₁₄₂-92,1%; S₃₀₆-98,7%; S₃₁₁-98,1%; T₃₃₂-74,8%; S₃₄₈-99,5%; S₃₅₃-90,1%; S₃₇₂-99,3%; Y₃₇₆-91,8%; S₄₂₃-73,3%;

Y₄₅₇-86,7 %

11. Гомология с подобными генами других видов и родов актинобактерий:

№	Название белка	Вид <i>Streptomyces</i>	% идентичности	% сходства	Ссылка на NCBI
1	F0F1 ATP synthase subunit beta	<i>S. xinghaiensis</i>	99	100	WP_019710005.1
2	F0F1 ATP synthase subunit beta	<i>S. albus</i>	99	100	WP_030545773.1
3	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit beta	<i>Streptomyces pini</i>	96	98	SFJ90200.1
4	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit beta	<i>S. radiopugnans</i>	96	98	SEQ71334.1
5	F0F1 ATP synthase subunit beta	<i>S. hygrosopicus</i>	96	98	WP_030823943.1
6	F0F1 ATP synthase subunit beta	<i>S. autolyticus</i>	95	97	AQA14087.1
7	ATP synthase subunit beta	<i>S. malaysiensis</i>	95	97	PNG92852.1
8	ATP synthase subunit beta	<i>S. violaceusniger</i>	95	97	KUL46569.1
9	F0F1 ATP synthase subunit beta	<i>S. castelarensis</i>	95	97	WP_086707228.1
10	ATP synthase subunit beta	<i>S. antioxidans</i>	95	97	OPF80538.1
11	ATP synthase subunit beta	<i>S. violaceusniger</i>	95	97	AEM81418.1
12	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit beta	<i>S. melanosporofaciens</i>	94	97	SEC61080.1

12. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой:
отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
63,3	472 a/a	Atp synthase subunit alpha heart isoform, mitochondrial	<i>Bos taurus</i>	2w6e, 2w6f, 2w6q, 2w6h
63,3	472 a/a	Bovine mitochondrial atp synthase	<i>Bos taurus</i>	5ara, 5are, 5arh, 5ari
63,3	472 a/a	Atp synthase from yeast mitochondria	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1qo1

ATP synthase subunit epsilon

1. Название гена: *atpC*

2. Номер последовательности в GenBank: KDS89931, SFRA_00895

3. Нуклеотидная последовательность: 378 п.н.

```

1 ttggctgctg agctgcacgt cgagctggtc gccgcggacc gcagtgtctg gtccggcgag
61 gccaccctgg tcgtcgcacg caccacatcg ggtgacatcg gcgtcatgcc cggccaccag
121 ccgctgctcg gtgtgctgga gaccggcccg gtgaccatcc gtacgaccga cggcggtagc
181 gtgctcgccg ccgtccacgg cggtttcatc tccttcgccc acaacaagct gtcgctgctc
241 gcggagatcg ccgagctggc cgaggagatc gacaccgccc gtgccgagcg ggccctggaa
301 cgagccaagt cggaatccga cgcgcgccc gagcggcgcg cggagatccg gctggtcgcg
361 gccgcgagca agcgtga

```

4. Название белка: ATP synthase subunit epsilon

5. Протяженность в аминокислотах, молекулярная масса: 125 а/к, 13,074 кДа

6. Аминокислотная последовательность:

```

1 MAAELHVELV AADRSVWSGE ATLVVARTTS GDIGVMPGHQ PLLGVLETGP VTIRTTDGGT
61 VLAAVHGGFI SFADNKLSLL AEIAELAEI DTARAERALE RAKSESDAAA ERRAEIRLVA
121 AASKR

```

7. Изоэлектрическая точка pI: 5,03

8. Доменная структура белка:

Регион " F₀F₁ ATP synthase subunit epsilon; Validated " – 2 - 124 а/к;

Сайты взаимодействия с субъединицей гамма (полипептидное связывание) –

8,11-13,15,18,40-44,67-72,78,80-82 а/к;

Сайты связывания эpsilon субъединиц (полипептидное связывание) –

13,29,45-46,48,64,66-68,82-83,85,88-89,91,98,112-113,115-116,119,121 а/к;

Сайты связывания с LBP (полипептидное связывание) –

23,25,31..32,34,36,38..40,54 а/к

9. Возможные молекулярные функции белка:

АТФ-связывание, протон-транспортирующая активность АТФ-синтазы, механизм вращения

10. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1 с вероятностью более 70% -

S₁₈-97,9%; T₂₂-87,3%; T₂₉-94,2%; T₆₀-71,0%; T₉₂-95,8%; S₁₀₄-99,8%; S₁₀₆-94,8%; S₁₂₃-83,3

11. Гомология с подобными генами других видов и родов актинобактерий:

№	Название белка	Вид <i>Streptomyces</i>	% идентичности	% сходства	Ссылка на NCBI
1	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	<i>S. albus</i>	98	99	WP_030545771.1
2	ATP synthase F1 subunit epsilon	<i>Streptomyces sp. Ru87</i>	91	96	PGH48306.1
3	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	<i>S. pathocidini</i>	90	97	WP_055471363.1
4	ATP synthase epsilon chain	<i>S. rubrolavendulae</i>	89	96	AOT61088.1
5	putative ATP synthase epsilon chain	<i>S. aurantiacus</i>	88	96	EPH41794.1
6	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	<i>S. somaliensis</i>	87	95	WP_010474571.1

12. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой:
отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
42,5	134 a/a	Crystal structure of the F1-atpase from the thermoalkaliphilic bacterium	<i>Bacillus sp.</i>	2qe7
42,4	132 a/a	Atp synthase	<i>Caldalkalibacillus thermarum</i>	5ik2
33,9	112 a/a	Atp synthase epsilon chain	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	2rq7
27,5	102 a/a	Structure of the E.coli F1-atp synthase inhibited by subunit epsilon	<i>Escherichia coli</i>	3oaa

Приложение 2

Таблица 1. Сравнение субъединиц F₁-части АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC19609 внутри рода *Streptomyces*.

	<i>Streptomyces fradiae</i>				
	α	β	γ	δ	ϵ
<i>Streptomyces xinghaiensis</i>	99%	99%	99%	99%	99%
<i>Streptomyces albus</i>	99%	99%	99%	98%	98%
<i>Streptomyces pathocidini</i>	97%	91%	83%	88%	90%
<i>Streptomyces albireticuli</i>	95%	92%	83%	80%	86%
<i>Streptomyces alboverticillatus</i>	96%	83%	82%	81%	83%
<i>Streptomyces roseoverticillatus</i>	95%	90%	83%	82%	87%
<i>Streptomyces albulus</i>	95%	91%	83%	80%	87%
<i>Streptomyces mobaraensis</i>	94%	93%	81%	77%	87%
<i>Streptomyces caatingaensis</i>	94%	93%	83%	76%	89%
<i>Streptomyces varsoviensis</i>	93%	91%	80%	80%	85%
<i>Streptomyces atratus</i>	94%	92%	83%	81%	87%
<i>Streptomyces violaceusniger</i>	94%	95%	81%	80%	84%
<i>Streptomyces wuyuanensis</i>	93%	91%	81%	77%	85%
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	94%	96%	81%	80%	84%
<i>Streptomyces sparsogenes</i>	94%	92%	79%	80%	84%
<i>Streptomyces hyaluromycini</i>	93%	88%	76%	77%	83%
<i>Streptomyces griseus</i>	93%	93%	81%	79%	87%
<i>Streptomyces himastatinicus</i>	93%	97%	81%	77%	85%
<i>Streptomyces humi</i>	93%	87%	76%	76%	84%
<i>Streptomyces melanosporofaciens</i>	93%	94%	81%	80%	84%
<i>Streptomyces pini</i>	92%	96%	83%	78%	87%
<i>Streptomyces radiopugnans</i>	92%	96%	85%	77%	88%

<i>Streptomyces antioxidantans</i>	93%	95%	80%	79%	84%
<i>Streptomyces iranensis</i>	93%	94%	80%	79%	84%
<i>Streptomyces megasporus</i>	91%	95%	82%	78%	82%
<i>Streptomyces rapamycinicus</i>	93%	95%	80%	79%	84%
<i>Streptomyces nanshensis</i>	89%	92%	82%	77%	78%
<i>Streptomyces sparsogenes</i>	94%	95%	79%	80%	84%
<i>Streptomyces abyssalis</i>	89%	91%	76%	72%	77%
<i>Streptomyces noursei</i>	92%	91%	77%	80%	82%
<i>Streptomyces nodosus</i>	92%	88%	77%	80%	82%
<i>Streptomyces rimosus</i>	91%	77%	80%	82%	85%
<i>Streptomyces venezuelae</i>	93%	90%	78%	79%	84%

Таблица 2. Сравнение субъединиц F₁-части АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC19609 с представителями типа *Actinobacteria*.

	<i>Streptomyces fradiae</i>				
	α	β	γ	δ	ϵ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	78%	76%	54%	38%	52%
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	72%	71%	51%	40%	39%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	74%	73%	45%	30%	38%
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	73%	72%	44%	30%	37%
<i>Bifidobacterium breve</i>	72%	72%	45%	32%	41%
<i>Bifidobacterium longum</i>	72%	72%	44%	33%	44%
<i>Lactobacillus brevis</i>	54%	62%	31%	27%	36%
<i>Lactobacillus fermentum</i>	57%	64%	34%	27%	39%
<i>Lactobacillus casei</i>	57%	63%	33%	27%	31%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	56%	62%	34%	29%	33%

Таблица 3. Сравнение субъединиц F₀-части АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC19609 внутри рода *Streptomyces*.

	<i>Streptomyces fradiae</i> F ₀		
	A	B	C
<i>Streptomyces xinghaiensis</i>	96%	99%	92%
<i>Streptomyces albus</i>	96%	98%	85%
<i>Streptomyces cellulosaе</i>	84%	89%	97%
<i>Streptomyces luteus</i>	82%	88%	86%
<i>Streptomyces humi</i>	79%	90%	85%
<i>Streptomyces jietaisiensis</i>	82%	87%	97%
<i>Streptomyces lavendulae</i>	79%	86%	99%
<i>Streptomyces katrae</i>	80%	85%	99%
<i>Streptomyces atratus</i>	84%	87%	97%
<i>Streptomyces sviceps</i>	82%	88%	96%
<i>Streptomyces lushanensis</i>	81%	84%	95%
<i>Streptomyces scopuliridis</i>	82%	83%	93%
<i>Streptomyces jeddahensis</i>	84%	90%	93%
<i>Streptomyces xylophagus</i>	81%	89%	93%
<i>Streptomyces seoulensis</i>	81%	88%	95%
<i>Streptomyces graminilatus</i>	83%	87%	94%
<i>Streptomyces flavidovirens</i>	79%	84%	92%
<i>Streptomyces prasinopilosus</i>	79%	88%	88%
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	82%	89%	94%
<i>Streptomyces scabiei</i>	77%	84%	90%
<i>Streptomyces mirabilis</i>	84%	88%	90%

<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	78%	92%	90%
<i>Streptomyces glaucescens</i>	83%	88%	90%
<i>Streptomyces zinciresistens</i>	78%	86%	90%
<i>Streptomyces exfoliatus</i>	75%	84%	88%

Таблица 4. Сравнение субъединиц F₀-части АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC19609 с представителями типа *Actinobacteria*.

	<i>Streptomyces fradiae</i>		
	F ₀		
	A	B	C
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	31%	37%	53%
<i>Bifidobacterium breve</i>	29%	37%	48%
<i>Bifidobacterium longum</i>	30%	38%	52%

Приложение 3

В таблицах 5-14 представлены значения RLU (relative light units), полученные в ходе проведённых экспериментов для определения ингибирующего действия производных олигомицина А на F₀F₁-АТФ-синтазу в препаратах инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609.

Таблица 5. Кинетика синтеза АТФ на модели интактных инвертированных мембранных везикул (int imv) *S. fradiae* ATCC 19609.

Время	Эксперимент (значения RLU)			Среднее значение (RLU)	Стандартное отклонение (RLU)	Коэффициент вариации (%)	За вычетом фона (RLU)	Погрешность (RLU)
	№1	№2	№3					
Фон	356417,00	344917,00	336520,00	345951,33	9988,75	2,89%		
1	458176,00	423064,00	426033,00	435757,67	19471,52	4,47%	89806,33	4012,93
10	452190,00	466238,00	459410,00	459279,33	7024,91	1,53%	113328,00	1733,41
20	418701,00	448170,00	429230,00	432033,67	14933,21	3,46%	86082,33	2975,43
40	495818,00	503595,00	462134,00	487182,33	22038,26	4,52%	141231,00	6388,75
60	503067,00	495271,00	498475,00	498937,67	3918,54	0,79%	152986,33	1201,52

Таблица 6. Кинетика синтеза АТФ на модели инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609, предобработанных левофлоксацином (lfx, 100 мкМ).

Время	Эксперимент (значения RLU)			Среднее значение (RLU)	Стандартное отклонение (RLU)	Коэффициент вариации (%)	За вычетом фона (RLU)	Погрешность (RLU)
	№1	№2	№3					
фон	332644,00	304503,00	299705,00	312284,00	17794,73	5,70%		
1 мин	411675,00	401642,00	395124,00	402813,67	8337,48	2,07%	90529,67	1873,79
10 мин	446644,00	418090,00	414073,00	426269,00	17759,21	4,17%	113985,00	4748,84
20 мин	410144,00	392148,00	397694,00	399995,33	9216,08	2,30%	87711,33	2020,91
40 мин	475511,00	447271,00	442572,00	455118,00	17816,45	3,91%	142834,00	5591,51
60 мин	471247,00	463243,00	457708,00	464066,00	6806,92	1,47%	151782,00	2226,34

Таблица 7. Кинетика синтеза АТФ на модели инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609, предобработанных дициклогексилкарбодимидом (DCCD, 100 мкМ).

Время	Эксперимент (значения RLU)			Среднее значение (RLU)	Стандартное отклонение (RLU)	Коэффициент вариации (%)	За вычетом фона (RLU)	Погрешность (RLU)
	№1	№2	№3					
фон	332678,00	326398,00	353080,00	337385,33	13949,96	4,13%		
1 мин	351687,00	345672,00	373988,00	357115,67	14918,17	4,18%	19730,33	824,22
10 мин	375110,00	401192,00	369946,00	382082,67	16749,38	4,38%	44697,33	1959,40
20 мин	371368,00	365976,00	392445,00	376596,33	13987,62	3,71%	39211,00	1456,38
40 мин	393034,00	386851,00	413728,00	397871,00	14076,25	3,54%	60485,67	2139,92
60 мин	409258,00	401342,00	398014,00	402871,33	5775,90	1,43%	65486,00	938,86

Таблица 8. Кинетика синтеза АТФ на модели инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609, преобработанных олигомицином А (olgA, 100 мкМ).

Время	Эксперимент (значения RLU)			Среднее значение (RLU)	Стандартное отклонение (RLU)	Коэффициент вариации (%)	За вычетом фона (RLU)	Погрешность (RLU)
	№1	№2	№3					
фон	340686,00	348012,00	332327,00	340341,67	7848,17	2,31%		
1 мин	397609,00	401614,00	375689,00	391637,33	13956,07	3,56%	51295,67	1827,93
10 мин	422384,00	407284,00	427395,00	419021,00	10468,78	2,50%	78679,33	1965,72
20 мин	415525,00	406253,00	396574,00	406117,33	9476,23	2,33%	65775,67	1534,79
40 мин	446552,00	420863,00	444885,00	437433,33	14374,52	3,29%	97091,67	3190,53
60 мин	431704,00	466483,00	454210,00	450799,00	17638,62	3,91%	110457,33	4321,91

Таблица 9. Синтеза АТФ (10 мин) на модели инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609 и везикул, преобработанных OlgA, Olg 1, Olg 2, Olg 3, Olg 4, Olg 17, Olg 18, DCCD (в конечных концентрациях 100 мкМ).

Название	Эксперимент (значения RLU)			Среднее значение (RLU)	Стандартное отклонение (RLU)	Коэффициент вариации (%)	За вычетом фона (RLU)	Погрешность (RLU)
	№1	№2	№3					
imv	452190,00	466238,00	459410,00	459279,33	7024,91	1,53%	113328,00	1733,41
lfx	459413,00	457996,00	460429,00	459279,33	1222,00	0,27%	146995,33	391,11
OlgA	422384,00	407284,00	427395,00	419021,00	10468,78	2,50%	78679,33	1965,72
Olg 1	471255,00	470484,00	436099,00	459279,33	20078,46	4,37%	146995,33	6426,24
Olg 2	370592,00	344385,00	399144,00	371373,67	27387,87	7,37%	52845,67	3897,23
Olg 3	388354,00	412523,00	424138,40	408338,47	18255,51	4,47%	67996,80	3039,92
Olg 4	423854,00	437651,00	386465,24	415990,08	26483,51	6,37%	97462,08	6204,81
Olg 17	489238,00	453094,00	435506,00	459279,33	27394,81	5,96%	146995,33	8767,89
Olg 18	443400,00	460976,00	466188,00	456854,67	11939,94	2,61%	119469,34	3122,34
DCCD	375110,00	401192,00	369946,00	382082,67	16749,38	4,38%	44697,33	1959,40