

*Мы посвящаем эту статью профессору  
Владимиру Петровичу Скулачеву  
по случаю его восьмидесятилетия и с признательностью  
за неоценимый вклад в науку, которую по его предложению  
много лет назад назвали биоэнергетикой.*

## ДРЕВНИЕ СИСТЕМЫ НАТРИЙ-КАЛИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА КЛЕТКИ КАК ПРЕДШЕСТВЕННИКИ МЕМБРАННОЙ БИОЭНЕРГЕТИКИ

© 2015 Д.В. Диброва<sup>1</sup>, М.Ю. Гальперин<sup>2</sup>,  
Е.В. Кунин<sup>2</sup>, А.Я. Мулкиджанян<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва

<sup>2</sup> National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine,  
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20894, USA

<sup>3</sup> School of Physics, Osnabrueck University, 49069 Osnabrueck, Germany;  
E-mail: amulkid@uos.de

<sup>4</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва

Поступила в редакцию 22.12.14

После доработки 26.01.15

Цитоплазма всех клеток – архей, бактерий и эукариот – содержит значительно больше калия, чем натрия, причем для многих клеточных процессов, в первую очередь, для синтеза белка, важно, чтобы ионов калия было существенно больше, чем ионов натрия. Подобная зависимость от ионов калия была ранее объяснена возникновением первых клеточных организмов в богатой калием среде. К настоящему времени предложено несколько геохимических сценариев для объяснения преобладания калия над натрием в местах обитания древних организмов. В частности, основываясь на преобладании калия над натрием в геотермальном паре, мы ранее предположили, что формирование первых клеточных организмов могло проходить на периферии древних бескислородных геотермальных полей в водоемах из парового конденсата, элементный состав которого должен был быть близок химии цитоплазмы современных клеток. Поскольку в морских и пресноводных водоемах концентрация ионов калия обычно существенно меньше, чем ионов натрия, заселение таких водоемов первыми клеточными организмами могло происходить только при наличии у них систем откачки ионов натрия из клетки. В настоящем обзоре рассматривается эволюционный сценарий, в соответствии с которым необходимость выживания в богатых натрием водоемах могла способствовать как постепенному уменьшению проводимости клеточных мембран, так и появлению различных редокс-, свето-, хемо- и осмозависимых систем откачки ионов натрия. Взаимодействие между несколькими исходно независимыми системами откачки ионов натрия привело к возникновению натрий-зависимой мембранной биоэнергетики, за которым последовало появление протонной биоэнергетики у бактерий и архей. Параллельно с этим происходило развитие систем, использующих натрий-калиевый градиент на плазматической мембране для нужд клетки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** АТФ-синтаза, натрий-движущая сила, протондвижущая сила, натриевый симпортер, мембранные ионные насосы, абиогенез, бескислородные геотермальные поля.

Принятые сокращения:  $\Delta\psi$  – трансмембранная разность электрических потенциалов; LUCA – общий предок клеточных организмов (Last Universal Cellular Ancestor); P-loop, P-петля – фосфат-связывающая петля – последовательность аминокислот в нуклеотид-связывающих белках, известная также как «А-мотив Уолкера»; KREEP – «Potassium [K], Rare Earth Elements and Phosphorus» (калий, редкоземельные элементы и фосфор).

\* Адресат для корреспонденции.

Около 40 лет назад Владимир Петрович Скулачев предположил, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -градиент на клеточной мембране может использоваться прокариотическими клетками для запасаения энергии трансмембранного протонного потенциала [1]. К этому времени хемиосмотическая гипотеза Питера Митчелла [2], в доказательство которой Скулачев и сотрудники внесли решающий вклад, получила всеобщее признание. Протонный потенциал (трансмембранная разность электрохимических потенциалов ионов водорода) считался основным энергетическим интермедиатом клетки [3]. Но буферная емкость протонного потенциала невелика. Поскольку физиологические концентрации ионов натрия и калия намного выше, чем концентрация протонов, энергетическая емкость  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -градиента должна превышать энергетическую емкость протонного градиента примерно в  $10^5$  раз [1, 4]. Скулачевым и сотрудниками было, в частности, показано, что у изученных бактерий и архей подвижность и внутриклеточный уровень АТФ падали намного быстрее в среде, богатой  $\text{K}^+$  (в отсутствие  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -градиента), чем в среде, богатой  $\text{Na}^+$ , причем если в калиевой среде истощение по АТФ было полным, в натриевой среде уровень внутриклеточного АТФ падал только наполовину [4].

Впоследствии, в 80-х гг. XX в., В.П. Скулачев опубликовал серию ключевых работ о том, что у некоторых бактерий градиент ионов  $\text{Na}^+$  может выполнять роль ассоциированного с мембраной энергетического интермедиата, аналогичного протонному градиенту у большинства организмов [5, 6]. В последующие годы феномен натриевой биоэнергетики был признан одним из фундаментальных механизмов биологического преобразования энергии [7, 8]. На основании филогеномного и структурного анализа мы недавно опубликовали ряд свидетельств того, что натриевая биоэнергетика не является экзотической адаптацией всего нескольких алкалофильных и термофильных прокариот, но весьма широко распространена и, вероятно, была исходной (предковой) формой мембранной биоэнергетики [9–12]. Эта гипотеза основывалась на реконструкции предковых последовательностей  $\text{Na}^+$ - и  $\text{H}^+$ -транспортирующих роторных мембранных АТФ-синтаз архей и бактерий, из которой следовало, что их предковая форма уже содержала аминокислотные остатки, необходимые для переноса ионов натрия [10]. Учитывая фундаментальное различие механизмов переноса ионов натрия и протонов через липидные мембраны [13, 14] и основываясь на давнем замечании В.П. Скулачева о том, что утечки липидной мембраны по ионам натрия предотвратить легче, чем утечки по протонам [15], мы предполо-

жили, что эволюционная первичность натриевой энергетики могла быть обусловлена тем, что непроницаемые для ионов натрия мембраны появились раньше мембран, не пропускающих протоны [10–12].

В то время как  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -градиент на клеточной мембране является универсальным для всех клеточных организмов, в т.ч. эукариотических,  $\text{Na}^+$ -зависимая энергетика, обнаруженная до сих пор только у ограниченного количества бактерий и архей, традиционно считалась экзотической особенностью алкалофилов, термофилов и некоторых патогенных бактерий [8, 16]. Соответственно,  $\text{Na}^+$ -зависимая энергетика и поддержание клеточного  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -гомеостаза обычно рассматриваются как два независимых феномена. Тем более неудивительно, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -гомеостаз (например, в животной клетке) обычно рассматривается независимо от митохондриальной протон-зависимой энергетики той же клетки. В данной работе мы показываем, что оба эти феномена, видимо, восходят к первичным мембранным системам откачивания натрия из древних клеток. Сперва мы обсуждаем, каким образом взаимодействие между изначально независимыми натриевыми помпами, которые могли быть вовлечены в поддержание градиента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  на мембране древних клеток, могло привести к возникновению натрий-зависимой энергетики, впоследствии давшей начало протон-зависимой биоэнергетике. Затем мы кратко рассматриваем то, каким образом клетки «учились» использовать  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -градиент для своих нужд.

### ПРЕОБЛАДАНИЕ ИОНОВ $\text{K}^+$ НАД ИОНАМИ $\text{Na}^+$ В ЦИТОПЛАЗМЕ

Хорошо известно, что цитоплазма живых клеток подавляющего большинства организмов содержит больше ионов калия, чем ионов натрия [17–19]. Отношение  $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+] < 1$  отмечалось только у некоторых представителей морских пикобактерий [20] и галофильных бактерий [21]. Анализ возможных причин этих исключений из общего правила [20, 22] выявил несколько факторов, которые могли привести к пониженным значениям  $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+]$  у этих двух групп организмов. Во-первых, измеряемая величина соотношения  $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+]$  может существенно занижаться из-за связывания ионов натрия с поверхностью клетки, которое невозможно предотвратить, если бактерии растут при высоких концентрациях ионов натрия. Во-вторых,  $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+] > 1$  в цитоплазме является свойством активно метаболизирующих клеток в фазе экспоненциального роста; при переходе клеток в стационарную

фазу роста данное соотношение заметно уменьшается и может даже стать меньше единицы [22]. Поддержание физиологических концентраций метаболитов в клетках в процессе их отделения от среды роста — нетривиальная задача, рутинно возникающая при экспериментальном изучении метаболизма прокариот и мембранного транспорта; в случае ионов калия и натрия проблема стоит еще острее, чем для сахаров и аминокислот. При нарушениях в метаболизме клетки из-за центрифугирования, фиксации клеток или иных процедур концентрации  $K^+$  и  $Na^+$  в цитоплазме должны быстро уравниваться с окружающей средой. Влияние двух поименованных факторов возрастает с увеличением отношения поверхности клетки к ее объему, т.е. оба фактора особо критичны для наиболее мелких клеток. В свете этого совсем неудивительно, что отношение  $[K^+]/[Na^+] < 1$  было отмечено только у самых небольших галотолерантных прокариот. Таким образом, величины  $[K^+]/[Na^+]$  в пределах 0,1–1,0, полученные для галофильных и морских бактерий [20–22], могут считаться заниженной оценкой реальной величины градиента  $K^+/Na^+$  (Аарон Орен (Aharon Oren), персональное сообщение). Исходя из вышеизложенного, можно считать, что концентрация  $K^+$  в активно растущих клетках существенно превышает концентрацию  $Na^+$ .

### ВОЗНИКНОВЕНИЕ ПЕРВЫХ КЛЕТОК В БОГАТЫХ ИОНАМИ $K^+$ УСЛОВИЯХ

Эволюционная важность преобладания ионов калия в цитоплазме была отмечена канадским биохимиком Арчибальдом Макаллумом в его основополагающей работе, где были сформулированы принципы эволюционной химии живых организмов (палеохимии), в особенности применительно к неорганической биохимии клетки [17]. Макаллум утверждал, что «поскольку клетка древнее окружающей ее ныне среды, соотношения между неорганическими веществами в клетке являются более древними, чем соответствующие соотношения в нынешней внешней среде: в плазме ли крови, в лимфе ли или в воде океанов и рек». Основываясь на данных о преобладании калия над натрием в клеточных тканях, Макаллум предположил, что первые клетки возникли в богатых ионами калия средах [17]. Дальнейшие исследования показали, что ионов калия больше, чем ионов натрия не только в эукариотических клетках, которые изучал Макаллум, но и, как указано выше, в цитоплазме бактерий и архей (см. [18] и ссылки в ней).

Высокое соотношение  $[K^+]/[Na^+]$  в подавляющем большинстве прокариот предполагает преобладание ионов  $K^+$  над ионами  $Na^+$  уже в цитоплазме общего предка архей и бактерий, которые, вероятно, разошлись более 3,5 млрд лет назад [23]. Важно, что соотношение  $[K^+]/[Na^+] > 1$  в цитоплазме, скорее всего, не является простой случайностью, «замороженной» в ходе эволюции. Широко известно, что преобладание ионов калия чрезвычайно важно для активности многочисленных универсальных ферментов, имеющих ключевое значение для клетки, таких как трансляционный фактор EF-Tu [24], рекомбиназа RadA [25], шаперон GroEL/Hsp60 [26], диолдегидратазы, включая глицеролдегидратазу [27], пируваткиназа [28], S-аденозилметионин-синтаза [29], диалкилглициндекарбоксилаза [30], мембранная пирофосфатаза [31], ЦДФ-диглицеридсинтаза [32] и многие другие ферменты. Соответственно, преобладание ионов  $K^+$  над ионами  $Na^+$  важно для многих клеточных процессов, в особенности для синтеза белка [33]. Было показано, что ионы калия помогают рибосомам приобретать функциональную конформацию [34], что может быть связано со специфической способностью ионов  $K^+$  стабилизировать определенные укладки РНК ([35] и ссылки в ней). Кроме того, рентгеноструктурный анализ рибосомы показал наличие иона калия в пептидилтрансферазном центре [36, 37], который, как следует из нескольких независимых эволюционных реконструкций, представляет собой эволюционно наиболее древнюю часть рибосомы [38–40]. Белковый синтез в самых первых клетках мог уже зависеть от ионов  $K^+$ , поскольку механизм катализа в пептидилтрансферазном центре, скорее всего, возник очень давно [39, 41], задолго до последнего общего предка клеточных организмов (LUCA, от англ. «Last Universal Cellular Ancestor»).

LUCA, по определению, представлял собой форму жизни, непосредственно предшествовавшую разделению клеточной жизни на бактериальный и архейный домены. Число белок-кодирующих генов, общих для практически всех современных клеточных форм жизни и потому, вероятно, присутствовавших уже у LUCA, сокращалось по мере секвенирования новых геномов, пока не остановилось на величине порядка 60 [41–43]. Распределение этих генов по функциям весьма неравномерно, что дает возможность получить некоторую информацию о LUCA (табл. 1). Подавляющее большинство универсальных генов участвует в трансляции [41, 44]; к этим генам относятся гены белков большой и малой субъединиц рибосомы, факторов трансляции и разнообразных аминоксил-тРНК-синтетаз [42, 43].

Таблица 1. Продукты генов, встречающихся у всех организмов, и функционально связанные с ними катионы и анионы

Функция белка	Шифр КФ (EC number)	Функционально важные неорганические анионы	Моновалентные катионы		Дивалентные катионы	
			функциональная зависимость	присутствие в некоторых структурах	функциональная зависимость	присутствие в некоторых структурах
1	2	3	4	5	6	7
<b>Трансляция и биогенез рибосомы</b>						
Рибосомальные белки		—	—	*МС <sup>+</sup>	—	Mg <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
Консервативные факторы трансляции (EF-G, EF-Tu, IF-1, IF-2, eIF5-a)	3.6.5.3	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	↑K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , ↓Na <sup>+</sup>	—	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
Большинство тРНК-синтетаз	6.1.1.-	PP <sub>i</sub>	↑K <sup>+</sup> , ↓Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
Псевдоуридинсинтаза	5.4.99.12	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	—	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
Аминопептидаза	3.4.11.18	—	—	МС <sup>+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
<b>Транскрипция</b>						
ДНК-зависимая РНК-полимераза [α, β, β']	2.7.7.6	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	—	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
<b>Репликация</b>						
АТФаза зажима (clamp loader) (pol III, субъединицы γ и τ)	2.7.7.7	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	—	—	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
Топоизомераза IA	5.99.1.2	—	МС <sup>+</sup>	—	Mg <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>
<b>Починка и рекомбинация</b>						
5'-3'-экзонуклеаза (в т.ч. N-концевой домен pol II)	3.1.11.-	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	—	—	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
Рекомбиназа RecA/RadA/Rad51	—	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
<b>Шапероны</b>						
Шаперон GroEL	3.6.4.9	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
<b>Метаболизм нуклеотидов и аминокислот</b>						
Тимидилаткиназа	2.7.4.9	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	—	Na	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
Тиоредоксинредуктаза	1.8.1.9	—	—	—	—	Mg <sup>2+</sup>
Тиоредоксин	—	—	—	—	—	Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
ЦДФ-диглицеридсинтаза	2.7.7.41	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	↑K <sup>+</sup> , ↓Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
<b>Преобразование энергии</b>						
Фосфоманномутаза	5.4.2.8	—	—	—	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
Каталитические субъединицы АТФ-синтазы	3.6.3.14	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	—	—	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
Протеолипидная субъединица АТФ-синтазы	3.6.3.14	—	—	—	—	—
<b>Коферменты</b>						
Глицина гидроксиметилтрансфераза	2.1.2.1	—	↓МС <sup>+</sup>	—	↓Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	—
<b>Секреция</b>						
Транслоказа белков, субъединица SecY	—	—	—	—	—	Zn <sup>2+</sup>
ГТФаза FtsY сигнал-распознающей частицы	3.6.5.4	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	—	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
<b>Разное</b>						
Предположительно ГТФазы (YchF, PF06071, 1JAL, 2OHF, 2DBY, 2DWQ, 1NI3)	—	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	K <sup>+</sup>	—	Mg <sup>2+</sup>	—
ДНК-праймаза (DnaG)	2.7.7.-	PP <sub>i</sub>	—	—	Zn <sup>2+</sup>	—
S-аденозилметионин диметилтрансфераза (KsgA)	2.1.1.48	—	—	—	Mg <sup>2+</sup>	—

Примечание. Списки повсеместно распространенных генов были взяты из работ Кунина [42] и Шарлебуа и Дулиттла [43], данные о зависимости белка от концентраций ионов — из базы данных BRENDA [155]. В соответствии с информацией базы данных BRENDA активность большинства Mg<sup>2+</sup>-зависимых ферментов проявляется и в среде с Mn<sup>2+</sup>. Поскольку концентрации ионов Mg<sup>2+</sup> в клетке порядка 10<sup>-2</sup> М, а концентрации ионов Mn<sup>2+</sup> — порядка 10<sup>-6</sup> М, данные о функциональной важности ионов Mn<sup>2+</sup> для многих белков в таблице отсутствуют. Присутствие металлов в структурах белков приведено в том виде, в каком оно содержится в записях PDB. «МС» обозначает «моновалентный катион». Таблица включает все белки, у которых есть ортологи во всех клеточных формах жизни, а также некоторые белки с общераспространенной функцией (например, ДНК-полимераза и ДНК-праймаза), в то время как соответствующие данной функции ферменты представлены двумя или несколькими неортологичными формами [41]. Стрелочки, направленные вверх, показывают активацию данным ионом, а стрелочки, направленные вниз — ингибирование. Если низкие концентрации иона активируют фермент, а высокие приводят к ингибированию, используется знак ↑↓. Ссылки на литературу, использованную при составлении таблицы, приведены в сопроводительных материалах к нашей работе [18].

Таким образом, похоже, что система синтеза белка LUCA была практически такой же сложной, как трансляционная система современных бактерий и архей. Более того, LUCA, скорее всего, умел синтезировать крупные (в т.ч. мультидоменные) белки, поскольку необходимый для сворачивания белковых молекул шаперон GroEL/Hsp60 также относится ко «всеобщим» белкам. Функции большинства остальных генов в универсальном наборе связаны с нуклеиновы-

ми кислотами (рекомбиназа RecA/RadA, фактор антитерминации транскрипции NusG, фактор транскрипционной паузы NusA, 5'-3'-экзонуклеаза, топоизомераза IA, АТФаза скользящего зажима — от англ. «clamp loader») или их мономерами — нуклеотидами (тимидилаткиназа, каталитические субъединицы роторной мембранной АТФазы).

Имеющаяся информация о зависимости активностей этих древних белков от различных

неорганических ионов свидетельствует о том, что в дополнение к ранее отмеченному предпочтению ими — из переходных металлов — ионов  $Zn^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  [45, 46] некоторые белки и функциональные системы специфически требуют наличия ионов  $K^+$ , в то время как ни один из исследованных древних белков не нуждается специфически в ионах  $Na^+$  (табл. 1) [18].

В частности, сравнительный структурный анализ нескольких трансляционных факторов, принадлежащих к суперсемейству ГТФаз, содержащих фосфат-связывающую петлю (Р-петлю или Р-loop — последовательность аминокислот в нуклеотид-связывающих белках, известная также как уолкерровский «А-мотив»), выявил консервативный остаток аспартата в участке Р-петли, который, вероятно, играет ключевую роль в связывании калия. Этот остаток абсолютно консервативен в трансляционных факторах, включая семейство EF-Tu/EF1, для представителей которого показана зависимость от  $K^+$  [24] (рис. 1, см. цветную вклейку). Этому остатку в других содержащих Р-петлю ГТФазах с известной зависимостью от  $K^+$  [47–51] соответствует аспарагин (рис 1, а, остаток помечен желтой стрелкой; рис. 2, см. цветную вклейку), но замена этого остатка на аспартат у ГТФазы YheN из *Bacillus subtilis* практически не влияла на ее ГТФазную активность [47].

Проведенный ранее филогенетический анализ суперсемейства ГТФаз, содержащих Р-петлю, выявил несколько белковых семейств, которые предположительно могли бы существовать уже у LUCA [52]. Связывающий калий остаток аспарагина или аспартата преимущественно консервативен в этих белках, к которым относятся (помимо собственно трансляционных факторов) семейства белков Obg, YuaF/Ygr210, HflX, YuaW (см. рис. 2 в работе Лейпе с соавт. [52]). Стоит отметить, что представители одного из этих древних семейств, а именно семейства Obg, играют ключевую роль в процессе подготовки рибосомы к работе [53]. Таким образом, наш сравнительный анализ последовательностей и структур ГТФаз, содержащих Р-петлю, показывает, что это древнее белковое суперсемейство, скорее всего, изначально активировалось ионами калия, в то время как функциональные замены ионов калия положительно заряженными остатками аргинина или лизина (способными активировать соответствующие ферменты в отсутствие ионов калия) могли происходить в отдельных семействах белков независимо друг от друга.

Мы провели филогеномный анализ для еще нескольких ферментов из группы калий-зависимых универсальных белков. Одно из таких се-

мейств включает АТФазы RecA/RadA, которые принадлежат к отдельному суперсемейству содержащих Р-петлю нуклеозидтрифосфатаз, имеющих только дальнее родство с упомянутыми выше содержащими Р-петлю ГТФазами. Это суперсемейство АТФаз называется ASCE (от англ. «Additional Strand, Catalytic E»), поскольку его представители содержат дополнительную  $\beta$ -складку между уолкеровскими А- и В-мотивами, а также имеют консервативный остаток глутаминна, способствующий депротонированию молекулы воды, атакующей фосфоангидридную связь в ходе ее гидролиза [54]. Существенно, что суперсемейство ASCE также включает каталитические субъединицы мембранных роторных АТФаз. Было показано, что активность белка RadA из археи *Methanococcus voltae* зависит от калия [25]. Кристаллическая структура белка RadA (идентификатор PDB 1XU4) содержит два сайта связывания ионов калия, один из которых оказывается связан в той же ориентации относительно АТФ и иона  $Mg^{2+}$ , что и остаток калия в содержащих Р-петлю ГТФазах. Интересно, что в отсутствие ионов  $K^+$  эти связывающие сайты заполняются молекулами воды; подобный эффект наблюдался ранее для ГТФазы FeoB [50]. Бактериальным гомологом белка RadA является рекомбиназа RecA. Проведенное ранее сравнение трехмерных структур белка RadA из археи *Methanococcus maripaludis* (идентификатор PDB 3EW9) и белка RecA из *Escherichia coli* [55] показывает, что при наложении участков Р-петли ионы  $K^+$ , связанные в белке RadA, накладываются на остатки лизина K248 и K250 белка RecA, которые, как было показано, служат каталитически активными остатками [56]. Будучи расположенными на поверхности мономера RecA и на удалении от сайта связывания АТФ, эти остатки входят в сайт связывания АТФ соседнего мономера при образовании олигомерного комплекса с молекулой ДНК.

Филогенетический анализ суперсемейства RecA/RadA показывает, что большая часть бактериальных белков содержит пару остатков лизина, в то время как археи и эукариоты (за исключением редких случаев горизонтального переноса от бактерий) содержат консервативный остаток аспартата (Asp302 у *M. voltae*) в той же позиции выравнивания (рис. 3 — схематичная версия дерева, рис. 4 — множественное выравнивание; см. цветную вклейку). Данный остаток аспарагиновой кислоты непосредственно связывает один из ионов калия своей боковой цепью [25]. Глубокое различие между бактериальной и архейно-эукариотической ветвями суперсемейства препятствует четкому определению исходного предкового состояния; тем не менее

одно свидетельство, по крайней мере, в пользу активации предковой формы фермента ионами калия, имеется. Все геномы эуриархей (*Euryarchaeota*) содержат гены двух белков данного семейства: один из этих белков (*RadA*) группируется с прочими архейными последовательностями, а второй образует отдельную ветвь на древе (*RadB* [57, 58]). Таким образом, эти архейные паралоги могли быть результатом древней геновой дупликации [59]. В белках *RadB* связывающий калий аспаргат заменен на два положительно заряженных остатка, но, в отличие от консервативной пары лизинов во всех бактериальных гомологах *RecA*, белки *RecB* могут содержать разные комбинации лизинов и аргининов.

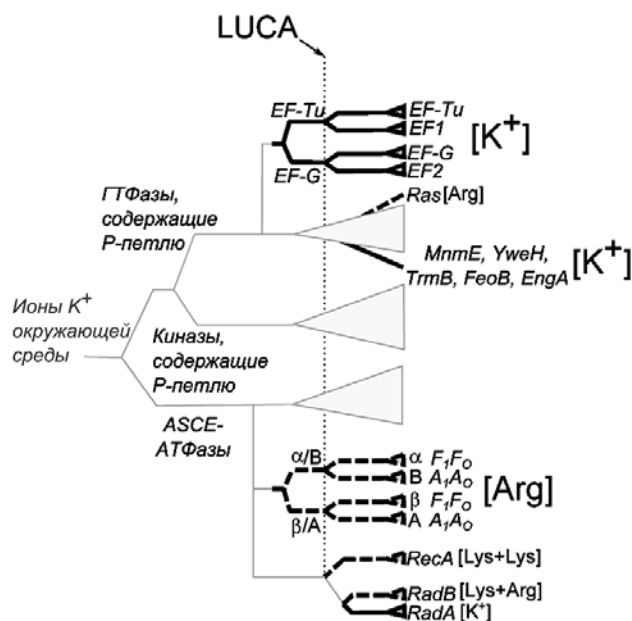
Каталитические субъединицы роторных мембранных АТФ-синтаз являются дальними родственниками белков *RecA/RadA* (их структурное наложение приведено на рис. 5, см. цветную вклейку). Пара лизинов, занимающая то же положение, что и ионы калия в *RadA*, располагается точно в том же месте, что и «аргининовый палец»  $\alpha$ -субъединицы роторной АТФ-синтазы. Этот остаток аргинина строго консервативен как в  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -субъединицах АТФ-синтазы, что соответствует отсутствию данных о какой-либо зависимости активности этого (хорошо изученного) фермента от калия.

Как видно, в гомологичных ферментах семейства *RecA/RadA/Rad51* и у  $\alpha/\beta$ -субъединиц АТФ-синтазы наблюдаются разные возможные способы организации каталитического сайта (мотив [KNK] в бактериальных белках *RecA*, мотив [KHR] у *RadB*, заменяющий ион калия остаток аргинина в  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицах АТФ-синтазы), в то время как  $K^+$ -связывающий мотив с ключевым остатком аспартата остается консервативным в архейных белках *RadA* и эукариотических *Rad51*.

Итак, несколько универсальных белков, имевшихся, вероятно, уже у LUCA, функционально зависят от ионов калия. Для некоторых из этих ферментов (содержащих Р-петлю ГТФаз, семейства *RecA/RadA*, семейства шаперонов *GroEL*) мы привели доводы в пользу зависимости их предковых форм от калия (см. выше и [18, 60]). Более того, опубликованные еще в 1960 г. данные Ловенштайна о зависимости скорости неферментативного трансфосфорилирования от концентрации моновалентных катионов [61] свидетельствуют, что крупные моновалентные катионы, такие как  $K^+$  или  $NH_4^+$ , существенно активируют трансфосфорилирование, в то время как ионы  $Na^+$  влияют на этот процесс незначительно. Таким образом, использование ионов  $K^+$  при катализе реакций переноса фосфатной группы могло предшествовать в эволюции ис-

пользованию положительно заряженных аминокислотных остатков (лизиновых или аргининовых «пальцев»). На рис. 6 мы приводим основанную на проведенном анализе схему эволюции каталитических сайтов нуклеозидтрифосфатаз, содержащих Р-петлю.

Необходимо отметить, что в тех экспериментах, где к калий-зависимым клеточным системам добавляли одновременно ионы  $Na^+$  и  $K^+$ , ионы натрия оказывали ингибирующее действие [33, 62] (единственное известное исключение — это семейство эукариотических динаминов, которые могут активироваться как ионами  $K^+$ , так и ионами  $Na^+$  [63]). Так, например, шаперонин типа II из *M. maripaludis* (*Mm-cpn*, от англ. «*M. maripaludis* chaperonin»), архейный гомолог *GroEL*, ингибировался, когда ионы  $K^+$  и  $Na^+$  добавлялись в одной и той же концентрации 100 мМ [62]. Таким образом, многие  $K^+$ -зависимые ферменты требуют соотношения  $[K^+]/[Na^+] \gg 1$  для оптимальной активности.



**Рис. 6.** Схема возможной эволюции каталитического сайта нуклеозидтрифосфатаз, содержащих Р-петлю. Тонкие серые линии показывают классификацию основных групп нуклеозидтрифосфатаз, содержащих Р-петлю, толстые линии показывают гипотетические события возникновения отдельных белковых семейств. Вертикальная пунктирная линия показывает предполагаемое положение LUCA на схеме; длины горизонтальных ветвей не отражают шкалу времени. Появление и распространение сайта связывания калия в семействе белков показано сплошными линиями, а появление и распространение лизиновых/аргининовых пальцев — штрихованными линиями

### БОГАТЫЕ КАЛИЕМ МЕСТА ОБИТАНИЯ НА ДРЕВНЕЙ ЗЕМЛЕ

В современных прокариотических клетках различие ионного состава между содержимым клетки и окружающей средой поддерживается за счет не пропускающих ионы клеточных мембран. Поскольку мембраны не являются абсолютно непроницаемыми, различные ионы постепенно «текут» через мембраны в соответствии с их градиентами концентрации. У прокариот входу ионов  $K^+$  и  $Na^+$  в клетку способствует электрический потенциал на клеточной мембране (отрицательный внутри клетки). В силу этого прокариотические клетки поддерживают соотношение  $[K^+]/[Na^+] > 1$  за счет селективного откачивания ионов натрия наружу. Благодаря трансмембранной разности электрического потенциала  $\Delta\psi$ , примерно равной  $-150$  мВ, концентрация ионов  $K^+$  внутри клетки может быть выше концентрации ионов  $K^+$  снаружи на 2–3 порядка [64, 65]. В большинстве случаев описанный механизм достаточен для поддержания цитоплазматической концентрации  $[K^+]$  на физиологическом уровне  $\sim 100$  мМ. В случае недостатка ионов  $K^+$  снаружи прокариотические клетки экспрессируют дополнительные системы для их активной закачки внутрь клетки; эти системы различаются в разных линиях прокариот [65, 66].

Как уже обсуждалось, наличие у первых клеток почти непроницаемых для ионов мембран, похожих на современные, не говоря уже о многочисленных ионных помпах, крайне маловероятно [12, 67, 68]. Как писал Макаллум 90 лет назад: «... самые первые организмы, вероятно, были мицеллярными или ультрамикроскопическими... Они, еще не имея ядра и окружающей мембраны, могли быть только очень примитивными. Поначалу химический состав самых первых организмов должен был подстраиваться под окружающую среду, так что диффузия привносила в мультимицеллярную массу неорганические соединения в той же пропорции, что и во внешней среде. В свою очередь ... все метаболические, синтетические, ассимиляционные и окислительные процессы зависели от подобным образом (извне) заданных физико-химических условий внутренней среды» [17].

Клеточные мембраны современных бактерий и архей построены из двухцепочечных липидов таким образом, что плотно упакованные двойные липидные «хвосты» делают мембрану способной поддерживать разности электрического и ионного потенциалов [69]. Двухцепочечные липиды архей и бактерий, однако, принципиально различаются между собой [70–72]. И у

бактерий, и у архей фосфолипиды содержат две гидрофобные углеводородные цепочки, присоединенные к глицерофосфату. Однако стереоизомеры глицерофосфата различны: бактерии используют *sn*-глицерол-3-фосфат (G3P), а архей — *sn*-глицерол-1-фосфат (G1P). За редким исключением различаются и сами гидрофобные «хвосты»: у бактерий ими служат жирные кислоты, а у архей — изопреноиды. В бактериальных липидах гидрофобные «хвосты» обычно присоединены к глицерофосфату сложноэфирными связями, в то время как у архей неполярные «хвосты» присоединены простыми эфирными связями. Различия наблюдаются не только на уровне химической структуры молекул фосфолипидов, но и на уровне эволюционного происхождения синтезирующих липиды ферментов архей и бактерий, большинство из которых либо негомолочны, либо являются дальними родственниками, но не ортологами [70–74]. Единственный общий для бактерий и архей метаболический путь, участвующий в синтезе липидов — это мевалонатный путь биосинтеза изопреноидов; родственны также ферменты, присоединяющие полярные головки к фосфатным группам предшественников липидов [70, 74, 75].

Учитывая радикальное различие в структурах и путях синтеза архейных и бактериальных липидов, было предположено, что мембраны самых ранних клеточных форм жизни вплоть до стадии LUCA могли быть построены из одноцепочечных изопреноидных липидов [76–80]. Однако мембраны, построенные из одноцепочечных липидов, на много порядков более проницаемы для моновалентных катионов, чем мембраны, состоящие из двухцепочечных липидов [67, 68, 81, 82]. Таким образом, в согласии с предположением Макаллума, цитоплазма первых клеток, скорее всего, находилась в равновесии с внешней средой по небольшим ионам и молекулам. Это уравнивание концентраций вовсе не означало состояния полного термодинамического равновесия, поскольку даже проницаемые липидные везикулы, состоящие из одноцепочечных липидов, могут надежно удерживать внутри полимерные молекулы, такие как белки и нуклеиновые кислоты [67, 68, 81, 82]. «Текучесть» первых мембран могла быть даже полезна древним клеткам [68, 83, 84]. В отсутствие интегральных мембранных транспортных белков, которые, вероятно, появились уже на относительно позднем этапе, после возникновения водорастворимых белков [12], проницаемость мембраны могла делать возможным «потребление» различных небольших молекул первыми клетками, что было показано экспериментально на модельных системах [84]. Эволю-



ция тогда должна была способствовать возникновению систем для захвата небольших молекул путем присоединения их к внутриклеточным полимерам, препятствующего их выходу обратно во внешнюю среду. Тем самым, проницаемые мембраны могли способствовать появлению различных полимераз, в т.ч. системы трансляции.

В предшествующем разделе приводились аргументы в пользу того, что клетки на раннем этапе эволюции могли уже иметь многочисленные  $K^+$ -зависимые ферменты, включая компоненты системы трансляции. Упомянутый ингибиторный эффект натрия на многие из этих  $K^+$ -зависимых ферментов свидетельствует против возможности эволюции этих ферментов в средах с высоким содержанием натрия. Поэтому возникновение данных систем могло происходить, только если соотношение  $[K^+]/[Na^+]$  в местах обитания первых клеток превышало единицу (альтернативные возможности проанализированы нами ранее [85]).

На современной Земле концентрация ионов  $Na^+$  превышает концентрацию ионов  $K^+$  не только в морской, но и в пресной воде. Древний океан, судя по всему, был не менее соленым, чем нынешний: об этом можно судить по химическому составу пузырьков воды, найденных в древних породах [86]. Так, первичные жидкостные включения пород из кратона Пилбара в восточной части Австралии (датируемые 3,49 млрд лет назад) содержат  $\sim 1$  М  $Na^+$ , что вдвое превышает концентрацию натрия в воде современного океана [87]. Проведенный нами поиск естественных земных условий, в которых соотношение  $[K^+]/[Na^+] > 1$ , обнаружил подходящий ионный состав только в паровом конденсате континентальных геотермальных систем [18]. Основная отличительная особенность этих систем состоит в отделении газовой (паровой) фазы от жидкой при кипении поднимающегося из глубины горячего геотермального флюида. Химический состав двух фаз радикально отличается: в жидкой фазе присутствуют большие количества ионов  $Na^+$  и  $Cl^-$ , в то время как паровая фаза специфически насыщена  $H_2S$ ,  $CO_2$  и  $NH_3$  [18, 88–92]. Паровая фаза также обогащена ионами  $K^+$  и характеризуется соотношением  $[K^+]/[Na^+] > 1$ , что обусловлено, вероятно, большей летучестью ионов  $K^+$  по сравнению с ионами  $Na^+$  [18]. В случае так называемых пародоминирующих геотермальных систем восходящий пар вырывается наружу через многочисленные фумаролы и грязевые котлы, образующие вместе геотермальные поля. Соответственно, было предположено, что первые клетки могли возникнуть в прудах и лужицах на периферии древних бескислородных геотермальных полей, где элементный химический состав конденсированного пара – в

отсутствие атмосферного кислорода – должен быть похож на содержание неорганических веществ в цитоплазме современных клеток (см. подробное обсуждение в наших работах [18, 85]).

После Макаллума [17] проблема  $[K^+]/[Na^+] > 1$  на древней Земле рассматривалась несколькими авторами [93, 94]. В частности, Маруяма с соавт. предложили еще один потенциальный источник жизненно необходимых ионов  $K^+$  [93]. Эти авторы основывались на данных о тугоплавких циркониевых гранулах, датированных 4,1–4,4 млрд лет и служащих единственными геологическими артефактами, оставшимися от катархейского периода развития Земли. Анализ этих гранул показал, что они образовывались в расплавах гранитных пород, происходящих из земной протокры, которая могла напоминать так называемые KREEP-насыщенные базальты Луны [95] (KREEP – от англ. «Potassium [K], Rare Earth Elements and Phosphorus»). KREEP-базальты широко распространены на современной Луне; считается, что они образовались при охлаждении лунного магматического океана [96]. По аналогии было предположено, что охлаждение земного магматического океана тоже должно было привести к образованию богатой KREEP протокры, которая впоследствии была утрачена из-за тектонического движения плит (см. [95] и ссылки в ней). Маруяма с соавт., исходя из того, что два из KREEP-элементов, а именно калий и фосфор, имеют критическое значение для жизни, предположили, что жизнь могла возникнуть в озерах первого, богатого KREEP континента Земли, которые, соответственно, могли содержать большие количества калия и фосфорных соединений [93].

Сценарий происхождения жизни на богатом KREEP первом континенте, предложенный Маруямой с соавт., не противоречит нашему сценарию бескислородных геотермальных полей. Поскольку теплопродукция молодой Земли должна была быть намного выше современной, геотермальные поля могли быть весьма распространены на поверхности первых континентов, вне зависимости от того, были они богаты KREEP или нет. В некотором смысле эти два сценария являются взаимодополняющими: так, KREEP-сценарий не дает детальных предсказаний химического состава первых континентальных водоемов. В отличие от него сценарий геотермальных полей предполагает, что химическое разделение могло приводить к насыщению паровой фазы не только уже упомянутыми  $H_2S$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$  и  $K^+$ , но также боратом, переходными металлами и органическими молекулами геотермального происхождения [18]. Все эти компоненты, обладающие повышенным сродством к газовой фазе [18], должны были быть критичес-

ки необходимы для образования первых биологических молекул [97]. В свою очередь сценарий бескислородных геотермальных полей ничего не говорит о времени возникновения первых клеток. Геотермальные поля, вероятно, оставались бескислородными в течение почти 2 млрд лет — от возникновения первых континентов до насыщения атмосферы кислородом, произошедшего примерно 2,5 млрд лет назад. КРЕЕР-сценарий в этом отношении более четко очерчивает временные рамки, поскольку связывает возникновение жизни с первым континентом [93], образование которого должно было произойти после охлаждения магматического океана ~4,4 млрд лет назад и который мог просуществовать не более нескольких сотен миллионов лет [93, 95].

### РОЛЬ $\text{Na}^+$ -ЭКСПОРТИРУЮЩИХ МЕХАНИЗМОВ

Приведенные выше свидетельства говорят в пользу того, что первые клетки возникли в среде с  $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+] > 1$ . Однако как морская, так и пресная вода, в принципе, содержат намного меньше калия, чем натрия, так что даже на древней Земле богатые  $\text{K}^+$  места, пригодные для обитания первых клеток, должны были быть ограничены как в пространстве, так и во времени [18, 93, 98]. Соответственно, распространению первых организмов из их богатой калием «колыбели» в новые места обитания могло препятствовать преобладание натрия над калием в заселяемых водоемах. Чтобы поддерживать процесс синтеза белка и прочие  $\text{K}^+$ -зависимые процессы в клетке, предковые организмы должны были уметь поддерживать соотношение  $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+] > 1$  в цитоплазме. Как уже отмечалось, у современных прокариот это обеспечивается целым набором откачивающих  $\text{Na}^+$  и закачивающих  $\text{K}^+$  систем, встроенных в непроницаемые для ионов мембраны. Поэтому заселение богатых натрием водоемов может рассматриваться как важный эволюционный переход, потребовавший возникновения различных мембранных систем, способных экспортировать ионы натрия из клетки [10, 12, 98]. Экспорт натрия во многих современных организмах осуществляется  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипортерами, использующими для этого протондвижущую силу. Помимо них, однако, существуют разнообразные первичные натриевые помпы, не зависящие от протондвижущей силы. Три класса первичных натриевых помп, а именно  $\text{Na}^+$ -транспортирующая оксалоацетатдекарбоксилаза,  $\text{Na}^+$ -транспортирующая НАДН:убихинон оксидоредуктаза и  $\text{Na}^+$ -транспортирующая метилаза коэнзима М, известны уже более 20 лет [99–101]. В последние

несколько лет этот список был пополнен еще несколькими ферментами:  $\text{Na}^+$ -транспортирующей ферредоксин:НАД<sup>+</sup> оксидоредуктазой (RNF), а также  $\text{Na}^+$ -транспортирующей пирофосфатазой и  $\text{Na}^+$ -транспортирующим бактериальным родопсином (табл. 2). Кроме того, есть серьезные основания считать, что встроенный  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипортерный модуль имеется у суперсемейства белков, включающих подобные митохондриальному комплексу I мембранные НАДН-дегидрогеназы, электрогенные мембранные гидрогеназы и формиатоксидазу. Благодаря данному модулю эти ферменты могут, по-видимому, де-факто функционировать как редокс-активные натриевые помпы [102–106]. Учитывая интерес микробиологов к анаэробным прокариотам, обитающим в самых различных условиях, список первичных натриевых помп, скорее всего, может удлиниться в ближайшее время. Разнообразие натриевых помп, некоторые из которых могут иметь древнее происхождение [12, 107, 108], показывает, что первые клетки могли обладать различными редокс-, свето-, хемо- и осмозависимыми системами откачки ионов натрия, обеспечивающими их выживание в богатых натрием условиях. Некоторая избыточность набора таких помп и разнообразие используемых ими источников энергии могло быть важно для выживания, в особенности в морской среде, компенсируя несовершенство примитивных мембран, которые, вероятно, еще были построены из однопепочных липидов.

Итак, продолжительный клеточный рост в условиях с соотношением  $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+] < 1$  требует поддержания цитоплазматического уровня  $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+] > 1$ , что может осуществляться путем постоянного экспорта ионов  $\text{Na}^+$ ; необходимость поддержания этого экспорта должна была быть существенной затратной статьёй для энергетики древних клеток. По этой причине рассмотрение возможных механизмов экспорта  $\text{Na}^+$  у древних организмов позволяет предложить механизм отбора, способствовавшего появлению все более непроницаемых для ионов липидных мембран. Очевидно, что организмы с менее проницаемыми мембранами получали существенное эволюционное преимущество еще и потому, что они могли расходовать меньше энергии на откачку ионов натрия из клетки.

### ВОЗНИКНОВЕНИЕ МЕМБРАННОЙ БИОЭНЕРГЕТИКИ

До сих пор в целях упрощения повествования мы почти не обсуждали мембранные роторные АТФ-синтазы (АТФазы), обеспечивающие современные клетки большей частью АТФ. Эти

Таблица 2. Откачивающие натрий помпы бактерий и архей

Наименование фермента, аббревиатура на английском языке	Год описания	Встречаемость по доменам	Библиографические ссылки
<b>Декарбоксилазы<sup>a</sup></b>			
Na <sup>+</sup> -транспортирующая оксалоацетатдекарбоксилаза (OAD)	1980	бактерии, археи	[99]
Na <sup>+</sup> -транспортирующая метилмалонил-КоА-декарбоксилаза (MMD)	1982	бактерии	[158]
<b>Оксидоредуктазы</b>			
Na <sup>+</sup> -транспортирующая НАДН:хинон-оксидоредуктаза (NQR)	1982	бактерии	[100]
Na <sup>+</sup> -транспортирующая ферредоксин:НАД <sup>+</sup> -оксидоредуктаза (RNF)	2012	бактерии, археи	[159]
<b>АТФазы</b>			
Na <sup>+</sup> -транспортирующая АТФаза F-типа	1988	бактерии	[160]
Na <sup>+</sup> -транспортирующая АТФаза A-типа	1993	бактерии, археи	[161, 162]
Na <sup>+</sup> -транспортирующая АТФаза N-типа	2010	бактерии, археи <sup>b</sup>	[115]
Na <sup>+</sup> -транспортер ABC-типа NatAB	1997	бактерии, археи	[163]
<b>Метилтрансферазы</b>			
Na <sup>+</sup> -транспортирующая N <sup>5</sup> -метил-тетрагидрометанооптерин : кофермент M-метилтрансфераза	1992	археи	[101]
<b>Пирофосфатазы</b>			
Na <sup>+</sup> -транспортирующая пирофосфатаза	2007	бактерии	[164]
<b>Светозависимые ионные помпы</b>			
Na <sup>+</sup> -транспортирующий родопсин	2013	бактерии	[165]

<sup>a</sup> Семейство белков также включает малонатдекарбоксилазу и глутаконил-КоА декарбоксилазу [156, 157].

<sup>b</sup> Опероны N-АТФаз, обнаруженные в геномах двух архей, *Methanosarcina acetivorans* и *Methanosarcina barkeri*, вероятно, имеют бактериальное происхождение и появились у этих архей в результате горизонтального переноса генов [115].

ферментативные комплексы являются обратимыми роторными молекулярными машинами, которые сопрягают транспорт ионов через мембрану с синтезом или гидролизом АТФ (см. [109–115] и ссылки в них). Роторные АТФазы разделяются на два отдельных типа, а именно F/N-тип, который присутствует у бактерий, некоторых архей, митохондрий и хлоропластов, и A/V-тип, который обнаруживается у большинства архей, некоторых бактерий, а также в цитоплазматических и вакуолярных мембранах эукариот. Роторные АТФазы сопрягают перенос протонов или ионов натрия через мембрану с

гидролизом/синтезом АТФ в выступающем из мембраны каталитическом комплексе, используя механизм «изменения силы связывания» (binding change mechanism). Эти ферментативные комплексы представляют собой динамомашину, в которых последовательный гидролиз молекул АТФ в каталитическом гексамере (часть статора) вызывает вращение оси ротора вместе с кольцом мембранных «протеолипидных» субъединиц (их количество варьирует от 8 до 15 в зависимости от видовой принадлежности организма). Кольцо (мембранная часть ротора) предположительно скользит относительно

мембранных субъединиц, образующих погруженную в мембрану часть статора, таким образом, что это вращение приводит к трансмембранному переносу ионов вдоль поверхности соприкосновения между мембранными субъединицами ротора и статора и, соответственно, генерации трансмембранного потенциала. Когда фермент функционирует как АТФ-синтаза, перенос протонов или ионов натрия между кольцом протеолипидных субъединиц и мембранным статором вызывает вращение кольца и выступающей в цитоплазму части ротора в противоположную сторону. Последовательное взаимодействие вращающейся центральной части с тремя каталитическими центрами гексамера приводит к образованию в них молекул АТФ. Ионная специфичность роторной АТФ-синтазы определяет природу биоэнергетического цикла в любом организме, поскольку только этот фермент, судя по всему, умеет синтезировать АТФ за счет мембранного потенциала. Ионная специфичность АТФ-синтазы определяется исключительно тем, содержат ли мембранные субъединицы полный набор аминокислотных лигандов, необходимых для связывания ионов натрия. Если по крайней мере один лиганд из набора отсутствует, фермент теряет способность переносить ионы  $\text{Na}^+$ , но обычно сохраняет способность переносить протоны (для переноса которых, в предельном случае, достаточно наличия только одного остатка аспартата/глутамата в определенной позиции) [9, 10, 116, 117].

Роторная АТФаза является единственным энергопреобразующим ферментным комплексом, некоторые субъединицы которого принадлежат к набору универсальных белков, скорее всего, имевшихся у LUCA [41, 42]. Были даже высказаны предположения, что этот фермент мог возникнуть еще до появления мембран и функционировать как АТФ-синтаза внутри стенок неорганических компартментов, в которых могли обитать сообщества первых репликаторов [62, 118], или что синтез АТФ этим ферментом мог идти в примитивных, «текучих» мембранах [119]. Это, однако, маловероятно. Условием синтеза АТФ роторной АТФ-синтазой является наличие диэлектрической мембраны, способной поддерживать трансмембранный протонный или натриевый потенциал с электрической компонентой  $\Delta\psi \sim 100\text{--}150$  мВ (что соответствует электрическому полю напряженностью более  $2 \times 10^7$  В/м). Даже современные, сложно устроенные мембраны «текут» при  $\Delta\psi \sim 100\text{--}150$  мВ, причем при  $\Delta\psi > 150$  мВ проводимость мембраны начинает расти нелинейно [120, 121]. За последние десятилетия было экспериментально показано, что любой дефект мембраны, влияющий

на ее диэлектрические свойства, приводит к разобщению – прекращению синтеза АТФ мембранной АТФ-синтазой (ионы в этом случае предпочитают свободно проходить через дефектный участок, а не идти «под нагрузкой» через АТФ-синтазу). Помимо этого, разобщение может вызываться амфифильными переносчиками ионов (ионофорами), что было впервые показано Скулачевым с соавт. [122, 123], или способными к переносу протонов одноцепочечными липидами, такими как жирные кислоты [124] (физиологическое значение которых было прояснено Скулачевым с соавт. [125, 126]), или лизофосфолипидами, образующимися при отщеплении одного из неполярных «хвостов» из-за гидролиза и ухудшающими диэлектрические свойства мембраны [127]. Из-за жестких ограничений, налагаемых на диэлектрические свойства мембраны, ни неорганические мембраноподобные осадочные образования, которые в принципе не могли быть свободными от дефектов стойкими диэлектриками, ни даже образованные одноцепочечными липидами мембраны не могли поддерживать синтез АТФ роторной АТФ-синтазой.

Тем не менее присутствие генов субъединиц роторной АТФ-синтазы, а именно ее каталитических субъединиц и образующей мембранное кольцо протеолипидной субъединицы, в наборе универсальных генов LUCA нуждается в объяснении. Поскольку каталитические субъединицы АТФ-синтазы гомологичны как некоторым РНК-хеликазам, так и АТФазе, обеспечивающей экспорт флагеллина из клетки при самосборке бактериального жгутика (флагеллы), и поскольку олигомерное кольцо протеолипидных субъединиц представляет собой заполненную липидом пору в мембране, было высказано предположение о том, что древняя версия фермента могла функционировать у LUCA не как АТФ-синтаза, а как белковая транслоказа, которая за счет гидролиза АТФ могла проталкивать молекулы белка через примитивную мембранную пору [12, 110]. Последующий переход к переносимому ионы ферменту мог быть вызван мутацией, затрудняющей перенос белка. Молекулы белка в таком случае должны были застревать в поре и вызывать, таким образом, ее вращение; этот сценарий в конечном итоге мог привести к возникновению сопряжения между гидролизом АТФ и трансмембранным переносом ионов вдоль поверхности вращающегося в мембране кольца. С учетом свидетельств в пользу эволюционной первичности натриевой мембранной энергетики было высказано предположение, что функцией первых переносимых ионов роторных АТФаз был экспорт ионов натрия

из клетки [10, 12]. В поисках «реликтов» подобных древних роторных помп, откачивающих  $\text{Na}^+$ , мы, используя филогеномный анализ, выявили отдельное семейство роторных АТФаз, практически все члены которого, судя по последовательностям их протеолипидных субъединиц, являются  $\text{Na}^+$ -переносящими АТФазами. Эти ферменты были названы N-АТФазами [115]. N-АТФазы кодируются высокомолекулярным опероном, который встречается в геномах всегда совместно с опероном, кодирующим «основную» АТФ-синтазу F- или A/V-типа, типичную для соответствующей группы прокариот. Основываясь на этих признаках, мы предположили, что N-АТФазы, которым свойственны некоторые примитивные черты и которые обнаруживаются у многих морских бактерий и архей, могут функционировать у современных организмов как экспортирующие ионы  $\text{Na}^+$  помпы [115]. Действительно, позднее было показано, что N-АТФаза галотолерантной цианобактерии *Aphanothece halophytica* способна переносить  $\text{Na}^+$  и повышать устойчивость к солевому стрессу у пресноводной цианобактерии *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [128, 129]. Эти данные позволяют отнести N-АТФазы к прокариотическим экспортерам натрия (табл. 2).

Как обсуждалось в предыдущем разделе, постепенное уменьшение проницаемости мембран для ионов должно было быть выгодным для клеток, поскольку оно позволяло им выживать в богатой  $\text{Na}^+$  среде за счет все меньших затрат энергии. В какой-то момент клеточные мембраны могли стать достаточно прочными для удержания значительного электрического потенциала. Нельзя исключить, что это событие было обусловлено возникновением двухцепочечных липидов. Как следствие, переносящие  $\text{Na}^+$  роторные АТФазы, функционировавшие как откачивающие ионы натрия помпы в условиях высокой солености древнего океана, могли начать синтезировать АТФ за счет трансмембранной разности электрохимических потенциалов ионов натрия (натрий-движущей силы), просто изменив направление вращения ротора. В морской воде трансмембранный натриевый градиент в 2–3 порядка мог обеспечивать синтез АТФ при величине  $\Delta\psi$  уже в 100 мВ. Такое переключение роторной АТФазы с экспорта  $\text{Na}^+$  на синтез АТФ должно было привести к возникновению натрий-зависимой мембранной биоэнергетики, суть которой состоит в сопряжении между мембранными ферментами, переносящими ионы натрия наружу, и «потребителями» образующегося натриевого градиента, выполняющими полезную для клетки работу. Наиболее важный вид такой работы – это как раз синтез АТФ роторной АТФ-синтазой. Роторные N-АТФазы,

которые, как уже отмечалось, функционируют как экспортеры натрия, способны к синтезу АТФ *in vitro* [129]; эти ферменты могут считаться «живыми ископаемыми», переходными формами на пути от простой откачки ионов  $\text{Na}^+$  из клетки к полному биоэнергетическому циклу, основанному на  $\text{Na}^+$ .

Каков же был эволюционный выигрыш от «разворота» роторной АТФазы? По мнению Буато и Паскаля центральная роль мембранной АТФ-синтазы в клетке обусловлена именно ее роторным механизмом [130]. Этот механизм был изначально предложен Глаголевым и Скулачевым для бактериального жгутика [131], потом рассмотрен Скулачевым применительно к роторной мембранной АТФазе [15] и, наконец, детально разработан для протон-переносящих роторных АТФаз Виком и Антонио [132] и Юнге с соавт. [133, 134]. В соответствии с этим механизмом для синтеза одной молекулы АТФ требуется последовательный перенос нескольких ионов через мембрану; при этом свободная энергия переноса ионов запасается пошагово в эластической деформации фермента до тех пор, пока достаточное для синтеза АТФ количество свободной энергии (около 60 кДж/моль ~600 мЭВ) не будет накоплено [134]. Следовательно, роторная АТФ-синтаза является уникальной машиной, способной накапливать небольшие порции доступной клетке энергии с тем, чтобы использовать их для синтеза АТФ [130]. Свободная энергия трансмембранного потенциала натрия (или протонов) на клеточной мембране обычно не превышает 250 мЭВ, что определяет величину энергетических затрат, необходимых для экспорта иона натрия или протона из клетки. Таким образом, выброс ионов натрия может осуществляться, например, редокс-зависимыми натриевыми помпами, такими как NQR или RNF, для которых разность редокс-потенциалов между физиологическими донорами и акцепторами электронов и составляет порядка 200 мВ. Без роторной АТФазы, служащей «трансформатором напряжения», эти (и многие другие) ферменты не смогли бы вкладываться в синтез АТФ.

Свободная энергия, достаточная для экспорта иона натрия из клетки и генерации ион-движущей силы, может быть даже меньше, если ионы  $\text{Na}^+$  транспортируются вместе с каким-нибудь анионом. Анионы различных карбоновых кислот, таких как ацетат, лактат или бутират, обычно являются конечными продуктами биохимических путей ферментации, которые, вероятно, лежали в основе гетеротрофного метаболизма на древней бескислородной Земле. С одной стороны, накопление кислых конечных продуктов внутри клетки должно было препят-

ствовать процессу ферментации (вызывая ингибирование продуктом), приводя в итоге к гибели клеток от закисления. С другой стороны, отрицательно заряженные органические кислоты не могут свободно проходить через гидрофобный барьер клеточной мембраны. Современные анаэробы экспортируют кислые конечные продукты наружу путем симпорта с положительно заряженными катионами, обычно ионами натрия или протонами, что приводит к генерации, соответственно, натрий-движущей или протон-движущей силы [135]. Возможность генерации мембранного потенциала по этому механизму была экспериментально показана для организмов как с протонной [135], так и с натриевой энергетикой [136]. В современных условиях этот механизм актуален только для анаэробов, т.к. дышащие организмы вместо экспорта кислых продуктов метаболизма обычно окисляют их дальше, получая дополнительную энергию в процессе дыхания. Однако на древней бескислородной Земле органические кислоты должны были быть конечными продуктами большинства прокариотических путей ферментации, а соответствующие симпортеры могли быть широко распространены и способны генерировать мембранный потенциал для синтеза АТФ практически «даром». То, что синтез АТФ у древних организмов мог поддерживаться даже выбросом отходов метаболизма из клетки, должно было быть очень выгодно.

Предлагаемый сценарий предполагает, что мембранная биоэнергетика возникла достаточно поздно, будучи лимитирована эволюцией мембранных липидов, и ей могла предшествовать эволюционная стадия, на которой различные независимые друг от друга  $\text{Na}^+$ -экспортирующие ферменты обеспечивали выживание древних клеток в условиях, где соотношение  $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+]$  было меньше единицы. Этот сценарий противоречит широко распространенному представлению об эволюционной древности хемиосмотического сопряжения (см., например, [137]). В пользу позднего его появления свидетельствует, однако, отсутствие хемиосмотического механизма синтеза АТФ на плазматической мембране эукариотических клеток, у которых основанный на протонах хемиосмос осуществляется только бактериальными эндосимбионтами — митохондриями и хлоропластами. Поскольку непроницаемые для ионов мембраны, построенные из двухцепочечных липидов, скорее всего, возникли независимо у бактерий и архей, хемиосмотический механизм синтеза АТФ тоже мог возникнуть у бактерий и архей независимо.

Вторичность, производность мембранной биоэнергетики, а также ее связь с экспортом  $\text{Na}^+$

следуют из важной, но, по нашему мнению, недооцененной работы Гарольда и Ван Брунт [138], в которой авторы показали, что бактериальные клетки могли расти — в богатой среде — в присутствии ионофоров, полностью рассеивающих мембранный потенциал, но только в присутствии по крайней мере 100 мМ  $\text{K}^+$  в среде роста. В аналогичной богатой среде, содержащей вместо ионов  $\text{K}^+$  ионы  $\text{Na}^+$ , бактерии в присутствии ионофоров расти не могли. Интересно отметить, что рассеивание мембранного потенциала не замедляло скорость роста в богатой  $\text{K}^+$  среде, что свидетельствует о достаточности получаемой от субстратного фосфорилирования энергии для поддержания роста клеток. Авторы сделали вывод, что мембранная биоэнергетика в определенных условиях не требуется для нормальной жизнедеятельности клеток. Действительно, имеющиеся оценки показывают, что поддержание  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -градиента требует затрат порядка 20–50% всей энергии клетки (см. [15, 139] и ссылки в них). Не случайно богатая  $\text{K}^+$  среда, в которой нет  $\text{Na}^+$ , такая как, например, М63, обычно используется в биотехнологии для повышения выхода клеточной массы. Клетки, которые, согласно Гарольду и Ван Брунт, прекрасно росли, несмотря на «дырявые» мембраны, в богатой  $\text{K}^+$  среде [138], могут рассматриваться как «реинкарнация» древних клеток с примитивными, несовершенными мембранами, которые могли размножаться в богатых  $\text{K}^+$  местах обитания, но не могли еще выживать в водоемах с высоким содержанием  $\text{Na}^+$ .

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТКОЙ $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ГРАДИЕНТА

Может показаться, что наблюдения Гарольда и Ван Брунт [138] находятся в противоречии с упомянутыми в самом начале нашего обзора данными Скулачева с соавт. о том, что истощенные прокариотические клетки дольше оставались подвижными в среде, содержащей  $\text{Na}^+$ , чем в среде, содержащей  $\text{K}^+$  [4]. Можно было ожидать, что в богатой  $\text{K}^+$  среде, где не надо было тратить энергию на выкачивание ионов  $\text{Na}^+$  наружу, больше энергии было бы доступно для поддержания подвижности бактерий. Детальное рассмотрение происходящих в клетке процессов показывает, что данное противоречие только кажущееся. В богатой натрием среде, физиологичной для *E. coli*, разрядка мембранного  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -градиента имеет, по крайней мере, два последствия, а именно: 1) кратковременное образование протонного потенциала, который может поддерживать вращение бактериального жгутика, и 2) по-

нижение цитоплазматического отношения  $[K^+]/[Na^+]$  с его обращением до  $<1,0$ , как наблюдается в случаях лимитирования клеток по энергии и/или питательным веществам во время стационарной фазы [22]. Обращение отношения  $[K^+]/[Na^+]$  должно блокировать активность многочисленных  $K^+$ -зависимых ферментов, в первую очередь АТФаз и ГТФаз, так что весь клеточный метаболизм должен фактически «выключаться» избытком ионов натрия, поскольку блокирование любой гидролазы в метаболическом пути инактивирует и весь путь. Т.е. с одной стороны, обращение отношения  $[K^+]/[Na^+]$  должно препятствовать полному расходу клеточного запаса АТФ и ГТФ, что и наблюдали Скулачев с соавт. [4]. С другой стороны, небольшое количество не вовлеченных в метаболические пути, а также не зависящих от  $K^+$  гидролаз получает в свое распоряжение весь запас АТФ/ГТФ. При низком соотношении  $[K^+]/[Na^+]$  мембранная роторная АТФаза, которая как раз от  $K^+$  не зависит (см. выше), может тогда гидролизовать АТФ, создавать протонный потенциал и таким образом поддерживать движение жгутика до тех пор, пока мембранный потенциал не упадет ниже пороговой для подвижности жгутика величины примерно в  $-100$  мВ [140]. В богатой же ионами  $K^+$  среде недостаток энергии не должен приводить к блокированию клеточного метаболизма ионами  $Na^+$ . Чувствительные к  $Na^+$  гидролазы будут оставаться активными и быстро израсходуют весь запас АТФ в клетке, что и наблюдалось в эксперименте [4]. В этом случае вращение жгутика не могло поддерживаться ни разрядкой  $Na^+/K^+$ -градиента, ни продолжительной генерацией протонного потенциала роторной мембранной АТФазой.

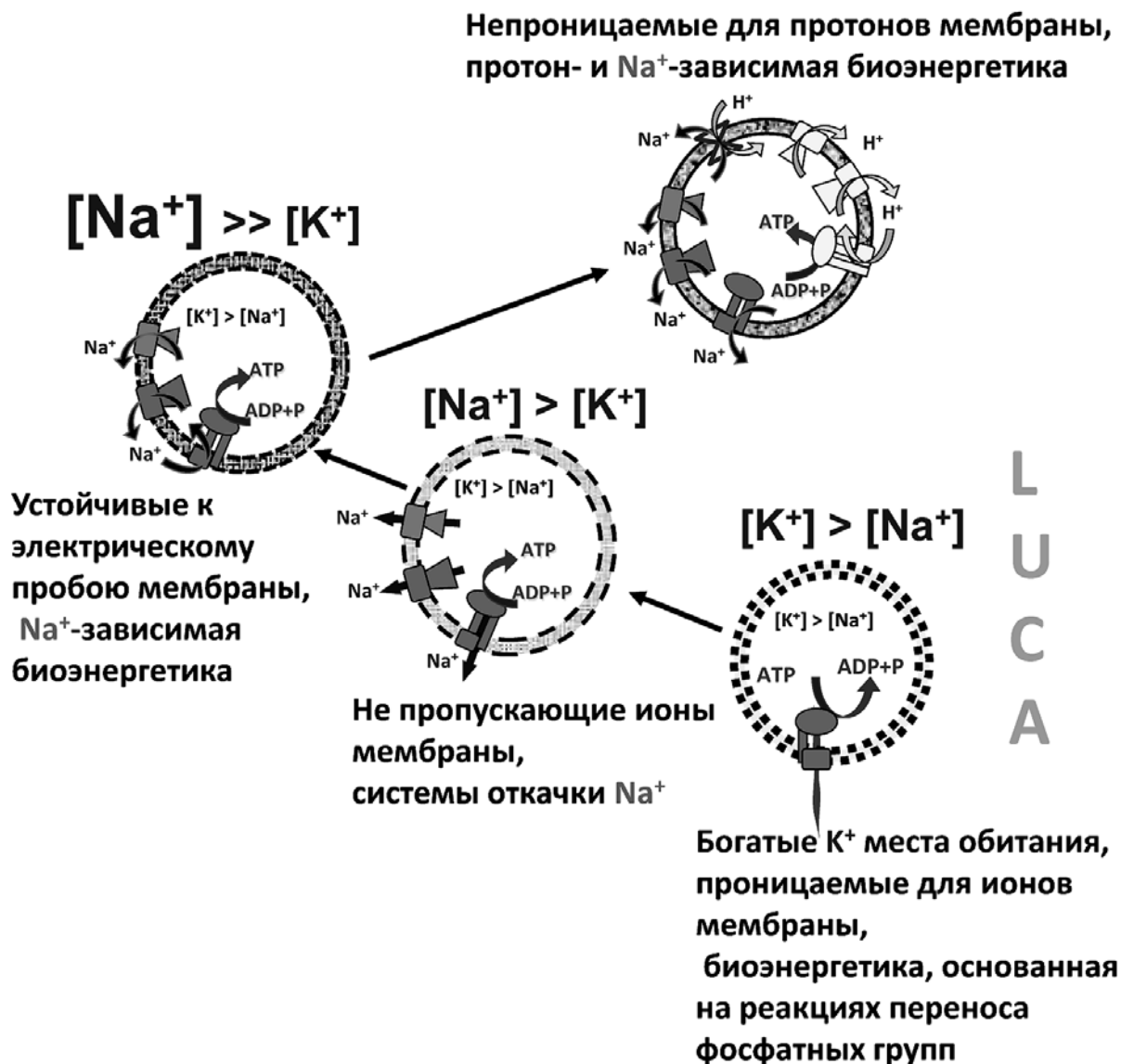
Таким образом, в условиях исчерпания доступных источников энергии разрядка градиента  $Na^+/K^+$  на клеточной мембране может временно поддерживать мембранный протонный (или натриевый) потенциал, как предполагали Скулачев с соавт. [1, 4, 141]. Кроме того, в естественных условиях с преобладанием  $Na^+$  над  $K^+$  исчезновение  $Na^+/K^+$ -градиента на мембране, уменьшая соотношение  $[K^+]/[Na^+]$  в клетке, должно приводить к ингибированию многих гидролаз и тем самым предотвращать полное истощение клеточного запаса АТФ/ГТФ. Во время стационарной (спящей) фазы сохраненный запас АТФ/ГТФ может быть использован для поддержания базовых и «ремонтных» функций, таким образом сохраняя клетку живой. При изменении условий к лучшему оставшийся запас АТФ/ГТФ может быть задействован при пробуждении клетки.

Итак, с одной стороны, неполная замена «древнего» кофактора  $K^+$  на остатки аргинина и

лизина в ходе эволюции заставляет клетки инвестировать до 50% своей энергии в поддержание градиента  $Na^+/K^+$  на клеточной мембране. С другой стороны, остаточная зависимость многих ферментов от ионов  $K^+$  как каталитических кофакторов и ингибирование таких ферментов ионами  $Na^+$  могут обеспечивать выживание клеток в неблагоприятных условиях лимитирования по энергии, когда соотношение  $[K^+]/[Na^+]$  в клетках может падать ниже единицы.

После перехода к многоклеточности приоритетом эволюции стало выживание всего организма, что привело к появлению различных апоптотических механизмов, позволяющих избавляться от нефункциональных клеток контролируемым образом. Было показано, что одним из активаторов системы апоптоза в клетках позвоночных может служить падение цитоплазматического соотношения  $[K^+]/[Na^+]$  (см. [142] и ссылки в ней). Неспособность клетки поддерживать физиологическое, высокое значение соотношения  $[K^+]/[Na^+]$  в цитоплазме может быть следствием недостатка АТФ и, тем самым, указывать на плохо функционирующие митохондрии. Поскольку поврежденные митохондрии, как известно, производят большое количество активных форм кислорода, уничтожение «скомпрометированных» с точки зрения энергетики клеток, согласно Скулачеву, становится необходимостью [143]. Похоже, что, по крайней мере, в некоторых случаях апоптоз тоже может запускаться нарушением  $Na^+/K^+$ -гомеостаза в клетке.

Предложенная выше и схематически изображенная на рис. 7 эволюционная схема подчеркивает общность происхождения  $Na^+/K^+$ -неравновесия на клеточной мембране и мембранной биоэнергетики. Скорее всего,  $Na^+/K^+$ -градиент возник раньше мембранной биоэнергетики одновременно с выходом древних клеточных организмов из специализированных, богатых калием геологических ниш.  $Na^+/K^+$ -градиент мог изначально поддерживаться многочисленными экспортирующими ионы  $Na^+$  помпами, использующими энергию химических и окислительно-восстановительных реакций, энергию света, а также, в случае  $Na^+$ -зависимых симпортеров, энергию осмотического градиента. Когда клеточные мембраны эволюционировали настолько, что смогли поддерживать электрохимический градиент ионов натрия достаточной величины, одна из таких экспортирующих помп, а именно  $Na^+$ -транслоцирующая роторная АТФаза, переключилась на синтез АТФ за счет энергии трансмембранного натриевого градиента, таким образом дав начало мембранной биоэнергетике, которая функционально связала



**Рис. 7.** Предполагаемый сценарий эволюции Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-гомеостаза и мембранной биоэнергетики. Предлагаемый сценарий включает переход от примитивных мембран, допускающих утечки как по ионам Na<sup>+</sup>, так и по протонам (пунктирные линии), через мембраны, которые могли содержать откачивающие натрий помпы и были достаточно прочными, чтобы поддерживать Na<sup>+</sup>-зависимую мембранную биоэнергетику (штрихованные линии), к мембранам современного типа, непроницаемым как для H<sup>+</sup>, так и для Na<sup>+</sup> (сплошные линии)

изначально независимые натриевые помпы друг с другом и сделала возможным использование «малых» квантов энергии для синтеза АТФ.

С последующей эволюцией клеточных мембран и по мере насыщения атмосферы кислородом ферменты мембранной биоэнергетики постепенно «разошлись» с клеточными системами поддержания Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-неравновесия. С одной стороны, прокариотические мембраны стали практически непроницаемы не только для ионов натрия, но и для протонов, и протон-зависимая энергетика, которая намного более вы-

годна в окислительной среде [11], стала более распространенной; при этом многие организмы продолжали использовать как натриевые, так и протонные помпы, функциональное сопряжение между которыми обеспечивали Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-антипортеры (рис. 7) [9, 11]. С другой стороны, у предков эукариот в ходе эволюции появился специализированный, особо эффективный фермент для поддержания Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-неравновесия, а именно Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФаза, которая сопрягает гидролиз одной молекулы АТФ с транспортом трех ионов Na<sup>+</sup> наружу из клетки и двух ионов K<sup>+</sup>



вовнутрь [98, 144]. Эта  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза принадлежит к крупному суперсемейству мембранных АТФаз Р-типа (P-type ATPases), которое никак не родственно содержащим Р-петлю нуклеозидтрифосфатазам. Оно включает большое количество ферментов, которые задействованы скорее в защите клетки от вредных веществ, например, в откачке ионов тяжелых металлов (таких как  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Cu}^+$ ), нежели в энергообеспечении [145, 146]. В итоге в клетках животных и растений основные системы натрий-калиевого обмена ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза и ионные каналы) не родственны мембранным системам преобразования энергии (протон-переносящими ферментам эндосимбиотически приобретенных митохондрий и хлоропластов). Неудивительно, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -гомеостаз клетки и мембранная биоэнергетика обычно рассматриваются как независимые феномены. В клетках животных единственными «реликтами» со времен предполагаемого древнего засилья  $\text{Na}^+$ -откачивающих помп остались многочисленные

$\text{Na}^+$ -зависимые мембранные транспортеры, а также сама плазматическая мембрана, которая, в отличие от мембран современных бактерий и архей, непроницаема для ионов натрия, но проницаема для протонов, как было проницательно замечено В.П. Скулачевым много лет назад [15].

Авторы выражают благодарность А.В. Богачеву, А.Ю. Бычкову, Ю.И. Вульффу и К.С. Макаровой за ценные советы и интерес к данной работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проекты № 14-50-00029, Д.В. Диброва, филогеномный анализ  $\text{K}^+$ -связывающих сайтов нуклеозидтрифосфатаз, и № 14-14-00592, А.Я. Мулкиджанян, реконструкция возникновения натрий-зависимой биоэнергетики), а также программы научных исследований Национальной медицинской библиотеки Национальных институтов здоровья США (М.Ю. Гальперин и Е.В. Кунин).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev, V.P. (1978) Membrane-linked energy buffering as the biological function of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  gradient, *FEBS Lett.*, **87**, 171–179.
2. Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, **191**, 144–148.
3. Skulachev, V.P. (1977) Transmembrane electrochemical  $\text{H}^+$ -potential as a convertible energy source for the living cell, *FEBS Lett.*, **74**, 1–9.
4. Brown, I.I., Galperin, M.Y., Glagolev, A.N., and Skulachev, V.P. (1983) Utilization of energy stored in the form of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  ion gradients by bacterial cells, *Eur. J. Biochem.*, **134**, 345–349.
5. Skulachev, V.P. (1984) Sodium bioenergetics, *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 483–485.
6. Skulachev, V.P. (1989) The sodium cycle: a novel type of bacterial energetics, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **21**, 635–647.
7. Cramer, W.A., and Knaff, D.B. (1990) *Energy transduction in biological membranes: a textbook of bioenergetics*, Springer Verlag.
8. Dimroth, P. (1994) Bacterial sodium ion-coupled energetics, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **65**, 381–395.
9. Hase, C.C., Fedorova, N.D., Galperin, M.Y., and Dibrov, P.A. (2001) Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 353–370, table of contents.
10. Mulikidjanian, A.Y., Galperin, M.Y., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2008) Evolutionary primacy of sodium bioenergetics, *Biol. Direct*, **3**, 13.
11. Mulikidjanian, A.Y., Dibrov, P., and Galperin, M.Y. (2008) The past and present of sodium energetics: may the sodium-motive force be with you, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 985–992.
12. Mulikidjanian, A.Y., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (2009) Co-evolution of primordial membranes and membrane proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 206–215.
13. Deamer, D.W. (1987) Proton permeation of lipid bilayers, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **19**, 457–479.
14. van de Vossenberg, J.L., Ubbink-Kok, T., Elferink, M.G., Driessen, A.J., and Konings, W.N. (1995) Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea, *Mol. Microbiol.*, **18**, 925–932.
15. Skulachev, V.P. (1989) *Membrane bioenergetics*, Springer Verlag, Heidelberg.
16. Konings, W.N. (2006) Microbial transport: adaptations to natural environments, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **90**, 325–342.
17. Macallum, A.B. (1926) The paleochemistry of the body fluids and tissues, *Physiol. Rev.*, **6**, 316–357.
18. Mulikidjanian, A.Y., Bychkov, A.Y., Dibrova, D.V., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (2012) Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 821–830.
19. Williams, R.J.P., and Frausto da Silva, J.J.R. (1991) *The biological chemistry of the elements*, Clarendon Press, Oxford.
20. Heldal, M., Scanlan, D.J., Norland, S., Thingstad, F., and Mann, N.H. (2010) Elemental composition of single cells of various strains of marine prochlorococcus and synechococcus using X-ray microanalysis, *Limnology and Oceanography*, **48**, 1732–1743.
21. Ventosa, A., Nieto, J.J., and Oren, A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 504–544.
22. Fagerbakke, K.M., Norland, S., and Heldal, M. (1999) The inorganic ion content of native aquatic bacteria, *Can. J. Microbiol.*, **45**, 304–311.
23. Battistuzzi, F.U., Feijao, A., and Hedges, S.B. (2004) A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land, *BMC Evol. Biol.*, **4**, 44.
24. Fasano, O., De Vendittis, E., and Parmeggiani, A. (1982) Hydrolysis of GTP by elongation factor Tu can be induced by monovalent cations in the absence of other effectors, *J. Biol. Chem.*, **257**, 3145–3150.

25. Wu, Y., Qian, X., He, Y., Moya, I.A., and Luo, Y. (2005) Crystal structure of an ATPase-active form of Rad51 homolog from *Methanococcus voltae*. Insights into potassium dependence, *J. Biol. Chem.*, **280**, 722–728.
26. Viitanen, P.V., Lubben, T.H., Reed, J., Goloubinoff, P., O’Keefe, D.P., and Lorimer, G.H. (1990) Chaperonin-facilitated refolding of ribulosebiphosphate carboxylase and ATP hydrolysis by chaperonin 60 (groEL) are K<sup>+</sup> dependent, *Biochemistry*, **29**, 5665–5671.
27. Toraya, T., and Fukui, S. (1977) Immunochemical evidence for the difference between coenzyme-B12-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase, *Eur. J. Biochem.*, **76**, 285–289.
28. Laughlin, L.T., and Reed, G.H. (1997) The monovalent cation requirement of rabbit muscle pyruvate kinase is eliminated by substitution of lysine for glutamate 117, *Arch. Biochem. Biophys.*, **348**, 262–267.
29. McQueney, M.S., and Markham, G.D. (1995) Investigation of monovalent cation activation of S-adenosylmethionine synthetase using mutagenesis and uranyl inhibition, *J. Biol. Chem.*, **270**, 18277–18284.
30. Toney, M.D., Hohenester, E., Keller, J.W., and Jansonius, J.N. (1995) Structural and mechanistic analysis of two refined crystal structures of the pyridoxal phosphate-dependent enzyme dialkylglycine decarboxylase, *J. Mol. Biol.*, **245**, 151–179.
31. Belogurov, G.A., and Lahti, R. (2002) A lysine substitute for K<sup>+</sup>. A460K mutation eliminates K<sup>+</sup> dependence in H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 49651–49654.
32. McCaman, R.E. and Finnerty, W.R. (1968) Biosynthesis of cytidine diphosphate-diglyceride by a particulate fraction from *Micrococcus cerificans*, *J. Biol. Chem.*, **243**, 5074–5080.
33. Spirin, A.S., and Gavrilova, L.P. (1969) *The ribosome*, Springer, N.Y.
34. Miskin, R., Zamir, A., and Elson, D. (1970) Inactivation and reactivation of ribosomal subunits: the peptidyl transferase activity of the 50S subunit of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **54**, 355–378.
35. Sigel, R.K.O., and Pyle, A.M. (2007) Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry, *Chem. Rev.*, **107**, 97–113.
36. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science*, **289**, 905–920.
37. Klein, D.J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2004) The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit, *RNA*, **10**, 1366–1379.
38. Bokov, K., and Steinberg, S.V. (2009) A hierarchical model for evolution of 23S ribosomal RNA, *Nature*, **457**, 977–980.
39. Davidovich, C., Belousoff, M., Bashan, A., and Yonath, A. (2009) The evolving ribosome: from non-coded peptide bond formation to sophisticated translation machinery, *Res. Microbiol.*, **160**, 487–492.
40. Fox, G.E., Tran, Q., and Yonath, A. (2012) An exit cavity was crucial to the polymerase activity of the early ribosome, *Astrobiology*, **12**, 57–60.
41. Koonin, E.V. (2003) Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor, *Nature Rev. Microbiol.*, **1**, 127–136.
42. Koonin, E.V. (2000) How many genes can make a cell: the minimal-gene-set concept, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **1**, 99–116.
43. Charlebois, R.L., and Doolittle, W.F. (2004) Computing prokaryotic gene ubiquity: rescuing the core from extinction, *Genome Res.*, **14**, 2469–2477.
44. Mushegian, A. (2005) Protein content of minimal and ancestral ribosome, *RNA*, **11**, 1400–1406.
45. Mulkidjanian, A.Y., and Galperin, M.Y. (2009) On the origin of life in the zinc world. 2. Validation of the hypothesis on the photosynthesizing zinc sulfide edifices as cradles of life on Earth, *Biol. Direct*, **4**, 27.
46. Mulkidjanian, A.Y., and Galperin, M.Y. (2010) On the abundance of zinc in the evolutionarily old protein domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 137.
47. Anand, B., Surana, P., and Prakash, B. (2010) Deciphering the catalytic machinery in 30S ribosome assembly GTPase YqeH, *PLoS One*, **5**, e9944.
48. Scrima, A., and Wittinghofer, A. (2006) Dimerisation-dependent GTPase reaction of MnmE: how potassium acts as GTPase-activating element, *EMBO J.*, **25**, 2940–2951.
49. Yamanaka, K., Hwang, J., and Inouye, M. (2000) Characterization of GTPase activity of TrmE, a member of a novel GTPase superfamily, from *Thermotoga maritima*, *J. Bacteriol.*, **182**, 7078–7082.
50. Ash, M.R., Guilfoyle, A., Clarke, R.J., Guss, J.M., Maher, M.J., and Jormakka, M. (2010) Potassium-activated GTPase reaction in the G protein-coupled ferrous iron transporter B, *J. Biol. Chem.*, **285**, 14594–14602.
51. Foucher, A.E., Reiser, J.B., Ebel, C., Housset, D., and Jault, J.M. (2012) Potassium acts as a GTPase-activating element on each nucleotide-binding domain of the essential *Bacillus subtilis* EngA, *PLoS One*, **7**, e46795.
52. Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases, *J. Mol. Biol.*, **317**, 41–72.
53. Kint, C., Verstraeten, N., Hofkens, J., Fauvart, M., and Michiels, J. (2014) Bacterial Ogb proteins: GTPases at the nexus of protein and DNA synthesis, *Crit. Rev. Microbiol.*, **40**, 207–224.
54. Leipe, D.D., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2003) Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins, *J. Mol. Biol.*, **333**, 781–815.
55. Li, Y., He, Y., and Luo, Y. (2009) Conservation of a conformational switch in RadA recombinase from *Methanococcus maripaludis*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **65**, 602–610.
56. Chen, Z., Yang, H., and Pavletich, N.P. (2008) Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures, *Nature*, **453**, 489–484.
57. Haldenby, S., White, M.F., and Allers, T. (2009) RecA family proteins in archaea: RadA and its cousins, *Biochem. Soc. Trans.*, **37**, 102–107.
58. Sandler, S.J., Hugenholtz, P., Schleper, C., DeLong, E.F., Pace, N.R., and Clark, A.J. (1999) Diversity of *radA* genes from cultured and uncultured archaea: comparative analysis of putative RadA proteins and their use as a phylogenetic marker, *J. Bacteriol.*, **181**, 907–915.
59. Lin, Z., Kong, H., Nei, M., and Ma, H. (2006) Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10328–10333.
60. Dibrova, D.V. (2013) Phylogenomic analysis of energy converting enzymes, University, Moscow.
61. Lowenstein, J.M. (1960) The stimulation of transphosphorylation by alkali-metal ions, *Biochem. J.*, **75**, 269–274.
62. Kusmierczyk, A.R., and Martin, J. (2003) Nested cooperativity and salt dependence of the ATPase activity of the archaeal chaperonin Mm-cpn, *FEBS Lett.*, **547**, 201–204.
63. Ash, M.R., Maher, M.J., Mitchell Guss, J., and Jormakka, M. (2012) The cation-dependent G-proteins: in a class of their own, *FEBS Lett.*, **586**, 2218–2224.
64. Harold, F.M., and Altendorf, K. (1974) *Current topics in membranes and transport* (Bronner, F., and Kleinzeller, A., eds), Academic Press, N.Y., pp. 1–51.
65. Corratge-Faillie, C., Jabnoue, M., Zimmermann, S., Véry, A.A., Fizames, C., and Sentenac, H. (2010) Potassium and

- sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family, *Cell Mol. Life Sci.*, **67**, 2511–2532.
66. Haupt, M., Bramkamp, M., Coles, M., Kessler, H., and Altendorf, K. (2005) Prokaryotic Kdp-ATPase: recent insights into the structure and function of KdpB, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 120–131.
  67. Deamer, D.W. (1997) The first living systems: a bioenergetic perspective, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 239–261.
  68. Deamer, D.W. (2008) Origins of life: how leaky were primitive cells, *Nature*, **454**, 37–38.
  69. Paula, S., Volkov, A.G., Van Hoek, A.N., Haines, T.H., and Deamer, D.W. (1996) Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness, *Biophys. J.*, **70**, 339–348.
  70. Boucher, Y., Kamekura, M., and Doolittle, W.F. (2004) Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea, *Mol. Microbiol.*, **52**, 515–527.
  71. Pereto, J., Lopez-Garcia, P., and Moreira, D. (2004) Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution, *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 469–477.
  72. Koonin, E.V., and Martin, W. (2005) On the origin of genomes and cells within inorganic compartments, *Trends Genet.*, **21**, 647–654.
  73. Koga, Y., and Morii, H. (2007) Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**, 97–120.
  74. Dibrova, D.V., Galperin, M.Y., and Mulkidjanian, A.Y. (2014) Phylogenomic reconstruction of archaeal fatty acid metabolism, *Environ. Microbiol.*, **16**, 907–918.
  75. Smit, A., and Mushegian, A. (2000) Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in Archaea: the lost pathway, *Genome Res.*, **10**, 1468–1484.
  76. Ourisson, G., and Nakatani, Y. (1994) The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol, *Chem. Biol.*, **1**, 11–23.
  77. Gotoh, M., Sugawara, A., Akiyoshi, K., Matsumoto, I., Ourisson, G., and Nakatani, Y. (2007) Possible molecular evolution of biomembranes: from single-chain to double-chain lipids, *Chem. Biodivers.*, **4**, 837–848.
  78. Nakatani, Y., Ribeiro, N., Streiff, S., Desaubry, L., and Ourisson, G. (2012) Search for the most primitive membranes: some remaining problems, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **42**, 497–501.
  79. Dibrova, D.V., Chudetsky, M.Y., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., and Mulkidjanian, A.Y. (2012) The role of energy in the emergence of biology from chemistry, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **42**, 459–468.
  80. Mulkidjanian, A.Y., and Galperin, M.Y. (2010) Evolutionary origins of membrane proteins. In *Structural bioinformatics of membrane proteins* (Frishman, D., ed.), Springer, Vienna, pp. 1–28.
  81. Chen, I.A., and Szostak, J.W. (2004) Membrane growth can generate a transmembrane pH gradient in fatty acid vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7965–7970.
  82. Mansy, S.S. (2010) Membrane transport in primitive cells, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a002188.
  83. Szostak, J.W., Bartel, D.P., and Luisi, P.L. (2001) Synthesizing life, *Nature*, **409**, 387–390.
  84. Mansy, S.S., Schrum, J.P., Krishnamurthy, M., Tobe, S., Treco, D.A., and Szostak, J.W. (2008) Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell, *Nature*, **454**, 122–125.
  85. Mulkidjanian, A.Y., Bychkov, A.Y., Dibrova, D.V., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (2012) Open questions on the origin of life at anoxic geothermal fields, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **42**, 507–516.
  86. Pinti, D.L. (2005) In *Lectures in astrobiology* (Gargaud, M., Barbier, B., Martin, H., and Reisse, J., eds), Springer Verlag, Berlin, pp. 83–111.
  87. Foriel, J., Philippot, P., Rey, P., Somogyi, A., Banks, D., and Menez, B. (2004) Biological control of Cl/Br and low sulfate concentration in a 3.5-Gyr-old seawater from North Pole, Western Australia, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **228**, 451–463.
  88. Aver'ev, V.V. (1961) *Proceedings of the volcanology laboratory of the Russian Academy of Sciences*, Moscow, **19**, pp. 90–98.
  89. White, D.E., Muffler, L.J.P., and Truesdell, A.N. (1971) Vapor-dominated hydrothermal systems compared with hot-water systems, *Econ. Geol.*, **66**, 75–97.
  90. Fournier, R.O. (2004) *Geochemistry and dynamics of the Yellowstone National Park Hydrothermal System*, US Geological Survey, Menlo Park, California.
  91. Bortnikova, S.B., Gavrilenko, G.M., Bessonova, E.P., and Lapukhov, A.S. (2009) The hydrogeochemistry of thermal springs on Mutnovskii volcano, southern Kamchatka, *J. Volcanol. Seismol.*, **3**, 388–404.
  92. Bychkov, A.Y. (2009) *Geochemical model of present-day ore formation in the Uzon Caldera*, GEOS, Moscow.
  93. Maruyama, S., Ikoma, M., Genda, H., Hirose, K., Yokoyama, T., and Santosh, M. (2013) The naked planet Earth: most essential pre-requisite for the origin and evolution of life, *Geosci. Front.*, **4**, 141–165.
  94. Galimov, E.M., Natochin, Yu.V., Ryzhenko, B.N., and Cherkasova, E.V. (2012) Chemical composition of the primary aqueous phase of the Earth and origin of life, *Geochem. Intern.*, **50**, 1048–1068.
  95. Guitreau, M., Blichert-Toft, J., Martin, H., Mojzsis, S.J., and Albarede, F. (2012) Hf isotope evidence from Archean granitic rocks for deep-mantle origin of continental crust, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **337–338**, 211–223.
  96. Warren, P.H., and Wasson, J.T. (1979) The origin of KREEP, *Rev. Geophys. Space Phys.*, **17**, 73–88.
  97. Benner, S.A., Kim, H.J., and Carrigan, M.A. (2012) Asphalt, water, and the prebiotic synthesis of ribose, ribonucleosides, and RNA, *Acc. Chem. Res.*, **45**, 2025–2034.
  98. Наточин Ю.В. (2007) Физико-химические детерминанты физиологической эволюции: от протоцелки к человеку, *Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова*, **92**, 57–72.
  99. Dimroth, P. (1980) A new sodium-transport system energized by the decarboxylation of oxaloacetate, *FEBS Lett.*, **122**, 234–236.
  100. Tokuda, H., and Unemoto, T. (1982) Characterization of the respiration-dependent Na<sup>+</sup> pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*, *J. Biol. Chem.*, **257**, 10007–10014.
  101. Becher, B., Muller, V., and Gottschalk, G. (1992) N<sup>5</sup>-methyl-tetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Go1 is an Na<sup>+</sup>-translocating membrane protein, *J. Bacteriol.*, **174**, 7656–7660.
  102. Roberts, P.G., and Hirst, J. (2012) The deactive form of respiratory complex I from mammalian mitochondria is a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, *J. Biol. Chem.*, **287**, 34743–34751.
  103. Mayer, F., and Muller, V. (2014) Adaptations of anaerobic archaea to life under extreme energy limitation, *FEMS Microbiol. Rev.*, **38**, 449–472.
  104. Gorecki, K., Hagerhall, C., and Drakenberg, T. (2014) The Na<sup>+</sup> transport in gram-positive bacteria defect in the Mrp antiporter complex measured with <sup>23</sup>Na nuclear magnetic resonance, *Anal. Biochem.*, **445**, 80–86.
  105. Moparthy, V.K., Kumar, B., Al-Eryani, Y., Sperling, E., Gorecki, K., Drakenberg, T., and Hagerhall, C. (2014) Functional role of the MrpA- and MrpD-homologous protein subunits in enzyme complexes evolutionary related to respiratory chain complex I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 178–185.

106. Lim, J.K., Mayer, F., Kang, S.G., and Muller, V. (2014) Energy conservation by oxidation of formate to carbon dioxide and hydrogen via a sodium ion current in a hyperthermophilic archaeon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 11497–11502.
107. Luoto, H.H., Belogurov, G.A., Baykov, A.A., Lahti, R., and Malinen, A.M. (2011) Na<sup>+</sup>-translocating membrane pyrophosphatases are widespread in the microbial world and evolutionarily precede H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases, *J. Biol. Chem.*, **286**, 21633–21642.
108. Baykov, A.A., Malinen, A.M., Luoto, H.H., and Lahti, R. (2013) Pyrophosphate-fueled Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport in prokaryotes, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **77**, 267–276.
109. Weber, J., and Senior, A.E. (2003) ATP synthesis driven by proton transport in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, *FEBS Lett.*, **545**, 61–70.
110. Mulikidjanian, A.Y., Makarova, K.S., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (2007) Inventing the dynamo machine: the evolution of the F-type and V-type ATPases, *Nature Rev. Microbiol.*, **5**, 892–899.
111. Boyer, P.D. (1997) The ATP synthase — a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717–749.
112. Pogoryelov, D., Krah, A., Langer, J.D., Yildiz, O., Faraldo-Gomez, J.D., and Meier, T. (2010) Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F<sub>0</sub> complex of ATP synthases, *Nature Chem. Biol.*, **6**, 891–899.
113. Nakanishi-Matsui, M., Sekiya, M., and Futai, M. (2013) Rotating proton pumping ATPases: subunit/subunit interactions and thermodynamics, *IUBMB Life*, **65**, 247–254.
114. Walker, J.E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1–16.
115. Dibrova, D.V., Galperin, M.Y., and Mulikidjanian, A.Y. (2010) Characterization of the N-ATPase, a distinct, laterally transferred Na<sup>+</sup>-translocating form of the bacterial F-type membrane ATPase, *Bioinformatics*, **26**, 1473–1476.
116. Muller, V., and Gruber, G. (2003) ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters, *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, 474–494.
117. Meier, T., Krah, A., Bond, P.J., Pogoryelov, D., Diederichs, K., and Faraldo-Gomez, J.D. (2009) Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na<sup>+</sup>-dependent F-ATP synthases, *J. Mol. Biol.*, **391**, 498–507.
118. Martin, W., and Russell, M.J. (2007) On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **362**, 1887–1925.
119. Sojo, V., Pomiankowski, A., and Lane, N. (2014) A bioenergetic basis for membrane divergence in archaea and bacteria, *PLoS Biol.*, **12**, e1001926.
120. Krishnamoorthy, G., and Hinkle, P.C. (1984) Non-ohmic proton conductance of mitochondria and liposomes, *Biochemistry*, **23**, 1640–1645.
121. Blicher, A., Wodzinska, K., Fidorra, M., Winterhalter, M., and Heimburg, T. (2009) The temperature dependence of lipid membrane permeability, its quantized nature, and the influence of anesthetics, *Biophys. J.*, **96**, 4581–4591.
122. Liberman, E.A., Topaly, V.P., Tsofina, L.M., Jasaitis, A.A., and Skulachev, V.P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, **222**, 1076–1078.
123. Skulachev, V.P., Sharaf, A.A., and Liberman, E.A. (1967) Proton conductors in the respiratory chain and artificial membranes, *Nature*, **216**, 718–719.
124. Lardy, H.A., and Pressman, B.C. (1956) Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 458–466.
125. Korshunov, S.S., Korkina, O.V., Ruuge, E.K., Skulachev, V.P., and Starkov, A.A. (1998) Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by mitochondria in the resting state, *FEBS Lett.*, **435**, 215–218.
126. Skulachev, V.P. (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation, *FEBS Lett.*, **294**, 158–162.
127. Mills, J.K., and Needham, D. (2005) Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1716**, 77–96.
128. Soontharapirakkul, K., and Incharoensakdi, A. (2010) Na<sup>+</sup>-stimulated ATPase of alkaliphilic halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* translocates Na<sup>+</sup> into proteoliposomes via Na<sup>+</sup> uniport mechanism, *BMC Biochem.*, **11**, 30.
129. Soontharapirakkul, K., Promden, W., Yamada, N., Kageyama, H., Incharoensakdi, A., Iwamoto-Kihara, A., and Takabe, T. (2011) Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains an Na<sup>+</sup>-dependent F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase with a potential role in salt-stress tolerance, *J. Biol. Chem.*, **286**, 10169–10176.
130. Boiteau, L., and Pascal, R. (2011) Energy sources, self-organization, and the origin of life, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **41**, 23–33.
131. Glagolev, A.N., and Skulachev, V.P. (1978) The proton pump is a molecular engine of motile bacteria, *Nature*, **272**, 280–282.
132. Vik, S.B., and Antonio, B.J. (1994) A mechanism of proton translocation by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit, *J. Biol. Chem.*, **269**, 30364–30369.
133. Engelbrecht, S., and Junge, W. (1997) ATP synthase: a tentative structural model, *FEBS Lett.*, **414**, 485–491.
134. Cherepanov, D.A., Mulikidjanian, A.Y., and Junge, W. (1999) Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase, *FEBS Lett.*, **449**, 1–6.
135. Otto, R., Sonnenberg, A.S., Veldkamp, H., and Konings, W.N. (1980) Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5502–5506.
136. Michel, T.A., and Macy, J.M. (1990) Generation of a membrane potential by sodium-dependent succinate efflux in *Selenomonas ruminantium*, *J. Bacteriol.*, **172**, 1430–1435.
137. Lane, N., Allen, J.F., and Martin, W. (2010) How did LUCA make a living? Chemiosmosis in the origin of life, *Bioessays*, **32**, 271–280.
138. Harold, F.M., and Van Brunt, J. (1977) Circulation of H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across the plasma membrane is not obligatory for bacterial growth, *Science*, **197**, 372–373.
139. Silver, I.A., and Erecinska, M. (1997) Energetic demands of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in mammalian astrocytes, *Glia*, **21**, 35–45.
140. Khan, S., Dapice, M., and Humayun, I. (1990) Energy transduction in the bacterial flagellar motor. Effects of load and pH, *Biophys. J.*, **57**, 779–796.
141. Skulachev, V.P. (1978) Membrane-linked energy buffering as the biological function of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> gradient, *FEBS Lett.*, **87**, 171–179.
142. Bortner, C.D., and Cidlowski, J.A. (2007) Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis, *Arch Biochem Biophys.*, **462**, 176–188.
143. Skulachev, V.P. (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell, *FEBS Lett.*, **397**, 7–10.
144. Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sorensen, T.L., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B., and Nissen, P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump, *Nature*, **450**, 1043–1049.

145. Aravind, L., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (1998) The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold, *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 127–129.
146. Chan, H., Babayan, V., Blyumin, E., Gandhi, C., Hak, K., Harake, D., Kumar, K., Lee, P., Li, T.T., Liu, H.Y., Lo, T.C., Meyer, C.J., Stanford, S., Zamora, K.S., and Saier, M.H., Jr. (2010) The P-type ATPase superfamily, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 5–104.
147. Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity, *BMC Bioinformatics*, **5**, 113.
148. Galperin, M.Y., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2015) Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D261–D269.
149. Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator, *Genome Res.*, **14**, 1188–1190.
150. Voorhees, R.M., Schmeing, T.M., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2010) The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome, *Science*, **330**, 835–838.
151. Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, *Syst. Biol.*, **59**, 307–321.
152. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2731–2739.
153. van Raaij, M.J., Abrahams, J.P., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (1996) The structure of bovine  $F_1$ -ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6913–6917.
154. Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions, *Acta Crystallogr.*, **60**, 2256–2268.
155. Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Sohngen, C., Rother, M., Lang, M., Munnareto, C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M., and Schomburg, D. (2013) BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 764–772.
156. Dimroth, P. (1997) Primary sodium ion translocating enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 11–51.
157. Dimroth, P., and von Ballmoos, C. (2008) ATP synthesis by decarboxylation phosphorylation, *Results Probl. Cell Differ.*, **45**, 153–184.
158. Hilpert, W., and Dimroth, P. (1982) Conversion of the chemical energy of methylmalonyl-CoA decarboxylation into a  $Na^+$  gradient, *Nature*, **296**, 584–585.
159. Biegel, E., and Muller, V. (2010) Bacterial  $Na^+$ -translocating ferredoxin:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 18138–18142.
160. Laubinger, W., and Dimroth, P. (1988) Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump, *Biochemistry*, **27**, 7531–7537.
161. Takase, K., Yamato, I., and Kakinuma, Y. (1993) Cloning and sequencing of the genes coding for the A and B subunits of vacuolar-type  $Na^+$ -ATPase from *Enterococcus hirae*. Coexistence of vacuolar- and  $F_0F_1$ -type ATPases in one bacterial cell, *J. Biol. Chem.*, **268**, 11610–11616.
162. Solioz, M., and Davies, K. (1994) Operon of vacuolar-type  $Na^+$ -ATPase of *Enterococcus hirae*, *J. Biol. Chem.*, **269**, 9453–9459.
163. Cheng, J., Guffanti, A.A., and Krulwich, T.A. (1997) A two-gene ABC-type transport system that extrudes  $Na^+$  in *Bacillus subtilis* is induced by ethanol or protonophore, *Mol. Microbiol.*, **23**, 1107–1120.
164. Malinen, A.M., Belogurov, G.A., Baykov, A.A., and Lahti, R. (2007)  $Na^+$ -pyrophosphatase: a novel primary sodium pump, *Biochemistry*, **46**, 8872–8878.
165. Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., Kogure, K., and Kandori, H. (2013) A light-driven sodium ion pump in marine bacteria, *Nature Commun.*, **4**, 1678.

## ANCIENT SYSTEMS OF Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> HOMEOSTASIS AS PREDECESSORS OF MEMBRANE BIOENERGETICS

D. V. Dibrova<sup>1</sup>, M. Y. Galperin<sup>2</sup>, E. V. Koonin<sup>2</sup>,  
A. Y. Mulkidjanian<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky  
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia*

<sup>2</sup> *National Center for Biotechnology Information, National Library  
of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda,  
Maryland 20894, USA*

<sup>3</sup> *Osnabrueck University, School of Physics, Osnabrueck 49069,  
Germany; E-mail: amulkid@uos.de*

<sup>4</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, School of Bioengineering  
and Bioinformatics, Moscow 119991, Russia*

Received December 22, 2014

Revision received January 26, 2015

The cytoplasm of archaea, bacteria, and eukaryotes contains substantially more potassium than sodium, and potassium cations are specifically required for many key cellular processes. These distinct ionic composition and requirements have been attributed to the emergence of the first cells in potassium-rich habitats. Different, albeit complementary, scenarios have been proposed for the primordial potassium-rich environments based on experimental data and theoretical considerations. Specifically, building on the observation that the potassium/sodium ratio is much greater than unity in vapor-dominated zones of inland geothermal systems, we argued that the first cells could have emerged in pools and puddles at the periphery of primordial anoxic geothermal fields, where the elementary composition of the condensed vapor would resemble the internal milieu of modern cells. Marine and freshwater environments generally show a potassium/sodium ratio less than unity. Therefore, to invade such environments, while maintaining the cytoplasmic potassium/sodium ratio over unity, primordial cells needed means to extrude sodium ions. The foray into new, sodium-rich habitats was the likely driving force behind the evolution of diverse redox-, light-, chemically-, or osmotically-dependent sodium export pumps and the increase in membrane tightness. Here we present a scenario that explains how the interplay between several, initially independent sodium pumps might have triggered the evolution of sodium-dependent membrane bioenergetics, followed by the separate emergence of proton-dependent bioenergetics in archaea and bacteria. We also discuss the development of systems that utilize the sodium/potassium gradient over cell membranes.

*Key words:* ATP synthase, sodium-motive force, proton-motive force, sodium symporter, membrane efflux pumps, abiogenesis, anoxic geothermal fields