

РОЛЬ ПЕТЛИ L5–6, СОЕДИНЯЮЩЕЙ МЕМБРАННЫЕ СЕГМЕНТЫ M5 И M6, В БИОГЕНЕЗЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ Pma1 H⁺-АТРАЗЫ ДРОЖЖЕЙ*

© 2015 В.В. Петров

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина РАН, 142290 Пущино Московской обл.,
пр. Науки, 5; электронная почта: vpetrov07@gmail.com*

Поступила в редакцию 26.05.14

После доработки 23.07.14

Экстрацитозольная петля L5–6 (714-DNSLDID) соединяет трансмембранные сегменты M5 и M6, вместе с сегментами M4 и M8 образующие сайты транспорта катионов в H⁺-, Ca²⁺-, K⁺, Na⁺-, H⁺, K⁺- и других P2-АТРазах. Для изучения структурно-функциональной организации Pma1 H⁺-АТРаза плазматической мембраны дрожжей использовали аланин- и цистеин-сканирующий мутагенез. Замены на Ala и Cys наиболее консервативного остатка (Leu-717) вызывали полное блокирование биогенеза фермента, который не достигал секреторных везикул. Замена D714A приводила к уменьшению экспрессии фермента в 5 раз и потере его активности, замена D714C полностью блокировала биогенез фермента. Замены остальных аминокислотных остатков не приводили к потере активности фермента. Были произведены дополнительные замены Asp-714 и Asp-720 на Asp и Glu. Из замен остатка Asp-714 только D714N частично восстанавливала биогенез мутантного фермента и его функционирование; в то же время все мутации, полученные для Asp-720, обладали значительной экспрессией и были активны. Экспрессированные мутантные ферменты (34–95% от уровня дикого типа) обладали значительной активностью (35–108%) и были пригодны для детального анализа. У одного из этих мутантов (I719A) наблюдали трехкратное уменьшение экспрессии, активности и транспорта H⁺ и его сопряжения с гидролизом АТФ, однако замена I719C мало отличалась от дикого типа. Таким образом, в двух случаях из семи замены на Ala и Cys серьезно нарушали биогенез и/или функционирование фермента. Результаты позволяют предположить важную роль аминокислотных остатков, образующих петлю L5–6, отвечающую, видимо, за правильное расположение трансмембранных сегментов M5 и M6 и других доменов Pma1 H⁺-АТРаза, в биогенезе и функционировании фермента и, возможно, участвующую в его регуляции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дрожжи, плазматическая мембрана, секреторные везикулы, Pma1 H⁺-АТРаза, экстрацитозольная петля, транспорт H⁺, сайт-направленный мутагенез.

H⁺-АТРаза плазматической мембраны дрожжей (Pma1), кодируемая геном *PMA1* [1], является жизненно необходимым ферментом, генерирующим трансмембранный электрохимический градиент протонов, за счет энергии которого функционируют различные вторичные транспортные системы и поддерживается ионный гомеостаз и внутриклеточный pH. Pma1 АТРаза относится к широко распространенной и физиологически важной группе P2-АТРАЗ [2], входящих в семейство P-АТРАЗ. Эти ионные насосы, присутствующие как в про-, так и в эукариотических клетках, используют энергию гидролиза АТФ для транспорта различных катионов (H⁺, Na⁺, K⁺, Cu⁺, Ag⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Mn²⁺) через клеточные и внутриклеточные мембраны [2, 3].

P2-АТРаза имеют одну главную каталитическую субъединицу, встроенную в липидный бислой посредством четырех трансмембранных гидрофобных сегментов у N-концевой и шести сегментов у C-концевой частей фермента разной длины и наклона. Эти сегменты образуют мембранный домен фермента (M), в котором находятся аминокислотные остатки, участвующие в транспорте катионов. Они связаны между собой пятью относительно короткими экстрацитозольными и четырьмя более длинными цитозольными петлями, самые важные из которых – так называемые большая L4–5 (между сегментами M4 и M5) и малая L2–3 (между сегментами M2 и M3), образующие домены N (АТФ- или нуклеотид-связывающий, включающий среднюю часть большой петли L4–5), P (содержащий сайт фосфорилирования и включающий N- и C-концевые части этой петли) и A (действующий как «привод» или заякориватель, включающий N-концевую часть фермента и малую петлю L2–3) [4, 5].

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM14-151, 28.12.2014.

Эти ферменты обладают общим каталитическим механизмом, при котором АТФ связывается с консервативным остатком аспарагиновой кислоты, находящимся в петле L4–5, с образованием макроэргического фосфорилированного интермедиата [6]. Стехиометрия катионного транспорта, как и его специфичность, различаются у различных представителей этого семейства, варьируя от 1–2 H^+ /АТФ у протонных насосов плазматических мембран грибов и растений [7–9] до 2 Ca^{2+} /АТФ и 3 Na^+ /2 K^+ /АТФ у Ca^{2+} - и Na^+, K^+ -АТФаз животных клеток [10]. Детерминанты катионной специфичности и стехиометрии транспорта находятся в сердцевине трансмембранных сегментов M4, M5, M6 и M8 этих ферментов, что было подтверждено рентгеноструктурным анализом Ca^{2+} - [4, 5] и Na^+, K^+ -АТФаз животных клеток [11, 12] и H^+ -АТФаз грибов [13] и растений [14].

Ранее сайт-направленный мутагенез Ca^{2+} - [15–18] и Na^+, K^+ -АТФаз [18–21] животных клеток выявил аминокислотные остатки в сегментах M4, M5, M6 и M8, ответственные за транспорт катионов; мутагенез H^+ -АТФазы плазматической мембраны дрожжей также обнаружил аминокислотные остатки в сегментах M4 [22], M5 [8, 23], M6 [8, 24, 25] и M8 [8, 9, 26, 27], замены которых нарушали нормальное функционирование фермента и/или его биогенез, в т.ч. изменяли сопряжение гидролиза АТФ и транспорта H^+ [8, 9, 24–27]. Некоторые замены ключевых аминокислотных остатков в этих сегментах P2-АТФаз (например, в M6 Ca^{2+}, Mn^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума дрожжевой клетки) могут даже изменить специфичность катионного транспорта [28, 29]. Таким образом, и мембранная, и цитозольная части фермента детально изучались и изучаются [8, 9, 15–32], в то время как данные о роли аминокислотных остатков в экстрацитозольной части P2-АТФаз малоисследованы и относятся в основном к изучению H^+, K^+ - и Na^+, K^+ -АТФаз животных клеток [33–37]. В частности был проведен цистеинсканирующий мутагенез трех экстрацитозольных петель Na^+, K^+ -АТФазы [33–35], а для H^+, K^+ -АТФазы было установлено, что ингибиторы, подобные омепразолу, реагируют с остатком Cys в петле между сегментами M5 и M6 [37]. В H^+ -АТФазе грибов изучалась только состоящая из двух аминокислотных остатков петля L1–2 с прилегающими частями сегментов M1 и M2 [38].

Во время реакционного цикла P2-АТФазы претерпевают существенные конформационные изменения, фермент при связывании АТФ и транспортируемых катионов обратимо переходит из состояния E1 с высоким сродством к

субстрату ($MgATP$ и транспортируемому катиону) и низким – к специфическому ингибитору ортованадату (аналогу продукта реакции ортофосфата) в состояние E2 с противоположными свойствами. При этом трансмембранные сегменты M1–M6, представляющие α -спирали, сгибаются, частично разворачиваются и даже выходят из мембраны, в то время как сегменты M7–M10 менее подвижны [5]. Ранее было показано, что замены аминокислотных остатков N-концевой части M6 существенным образом влияли на биогенез и/или функционирование Pma1 АТФазы дрожжей [24, 25]. Т.к. связывающая сегменты M5 и M6 короткая петля L5–6 образует вместе с ними так называемую шпильку M5–M6 [39–41], логично предположить, что остатки, образующие петлю, могут играть важную роль в структурно-функциональной организации фермента.

Результаты, описанные в настоящей статье, являются продолжением систематического изучения Pma1 H^+ -АТФазы плазматической мембраны дрожжей и сфокусированы на экстрацитозольной петле L5–6, соединяющей C-концевую часть сегмента M5 и N-концевую часть сегмента M6, с целью обнаружения аминокислотных остатков, которые могли бы играть роль в гидролизе АТФ и транспорте протонов или других аспектах биогенеза и функционирования фермента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штамм дрожжей. В работе использовали штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* SY4 (MATA; *ura3–52; leu2–3, 112; his4–619; sec6–4; GAL; pma1::YipGAL-PMAl*) [42], в котором присутствовали хромосомная (PMAl) и плазмидная (*pma1*) копии гена, кодирующего Pma1 H^+ -АТФазу. В штамме SY4 хромосомная копия гена АТФазы дикого типа находилась под контролем промотора GAL1 ($P_{GAL-PMAl}$), плазмидная (на центромерной плазмиде YCrp2HSE) – под контролем индуцируемого тепловым шоком промотора HSE ($P_{HSE-pma1}$) [42], при этом сам плазмидный ген *pma1* был или родительского типа, или мутантный. Штамм SY4 также содержал температурно-чувствительную мутацию в гене SEC6, блокирующую слияние секреторных везикул с плазматической мембраной при тепловом шоке и приводящую к накоплению секреторных везикул.

Сайт-направленный мутагенез. Для введения мутаций во фрагмент BglII-SalI (519 п.н.) гена *pma1*, который был предварительно субклонирован в модифицированную версию плазмиды Bluescript («Stratagene», США), использовали набор для олигонуклеотид-направленного мута-

гене́за («Amersham», США) или ПЦР [8, 9, 43]. По завершении мутагенеза фрагменты секвенировали для подтверждения наличия мутаций и отсутствия нежелательных замен других оснований. Затем этими фрагментами с помощью рестрикционных эндонуклеаз *Bgl*II, *Hind*III, *Sac*I, *Sal*I и T4 ДНК-лигазы («New England Biolabs», США) последовательно замещали соответствующие участки в плазмиде pPMA1.2, несущей полную кодирующую последовательность гена *pma1* [42]. Для получения экспрессии Pma1 H⁺-АТФазы в секреторных везикулах фрагмент *Hind*III-*Sac*I (3,77 т.п.н.), содержащий кодирующую последовательность гена, с помощью рестрикционных эндонуклеаз *Hind*III и *Sac*I и T4 ДНК-лигазы переносили в центромерную плазмиду YCr2HSE под контроль промотора HSE (*P*_{HSE}-*pma1*), которой (YCr2HSE-PMA1) трансформировали штамм SY4 [42].

Выделение секреторных везикул. Для получения секреторных везикул клетки штамма SY4 выращивали при 23° до середины логарифмической фазы роста ($A_{600} \sim 0,7-1,0$) на жидкой среде, содержащей 0,67 г/л YNB («Difco», США), 20 мг/л гистидина и 2%-ную галактозу, а затем отмывали от среды с галактозой и переносили на среду, содержащую 2%-ную глюкозу. Через 3 ч инкубации с глюкозой дрожжи подвергали тепловому шоку, повышая температуру до 39°, и инкубировали еще 2 ч. За 10 мин до окончания теплового шока к суспензии клеток добавляли 10 мМ NaN₃, который блокировал метаболизм, предотвращая слияние везикул с плазматической мембраной [42], и в течение 10 мин охлаждали во льду. Клетки осаждали центрифугированием, из них получали сферопласты, которые обрабатывали конканавалином А для утяжеления плазматических мембран, как описано ранее [42]. После получения сферопластов все последующие процедуры проводили при 0–4°. Секреторные везикулы, содержавшие вновь синтезированную АТФазу, выделяли с помощью дифференциального центрифугирования и гель-фильтрации [8, 42, 43] или центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [8, 9] и суспендировали в буфере, содержавшем 0,8 М сорбит, 10 мМ триэтанолламин-уксусную кислоту, рН 7,2, 1 мМ ЭДТА, 2 мкг/мл химостатина и по 1 мкг/мл лейпептина, пепстатина и апротинина, как описано ранее [8, 43, 44].

Метаболическое мечение, иммунопреципитация и трипсинолиз. Для обнаружения синтеза мутантных АТФаз, которые не были способны достичь секреторных везикул, клетки SY4 переносили с галактозной на глюкозную среду, как описано выше, и метаболически метили, инкубируя с [³⁵S]-метионином. Затем выделяли сум-

марную мембранную фракцию, которую обрабатывали трипсином в соотношении трипсин : белок 1 : 20, подвергали Ds-Na-ПААГ-электрофорезу, проводили иммунопреципитацию с антителами к близкородственной H⁺-АТФазе плазматической мембраны *Neurospora crassa* [45] и обрабатывали, как описано ранее [46].

Количество экспрессированного белка Pma1 АТФазы в секреторных везикулах определяли с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза и иммуноблоттинга, как описано ранее [8, 42, 43]. Блотты обрабатывали поликлональными антителами к Pma1 H⁺-АТФазе, а затем [¹²⁵I]-белком А («ICN», США). Уровень экспрессии мутантной Pma1 АТФазы в секреторных везикулах определяли с помощью прибора PhosphorImager, оснащенного программой ImageQuant (Molecular Dynamics, США), и выражали в процентном отношении от количества фермента в штамме дикого типа, выделяемого в этот же день [43].

Определение АТФазной активности проводили при 30° в 0,5 мл инкубационной смеси, содержащей 10 мМ MgSO₄, 5 мМ Na₂АТФ, 50 мМ MES-Tris, рН 5,7, 5 мМ KN₃, АТФ-регенерирующую систему (5 мМ фосфоенолпируват и 50 мкг/мл пируваткиназы, 40 Е/мг белка; «Sigma-Aldrich», США) в присутствии и в отсутствие 100 мкМ ортованадата натрия [9, 42, 43]. Для определения константы ингибирования АТФазы ионами ортованадата исходный раствор Na₃VO₄ перед использованием кипятили в течение 3–5 мин на водяной бане для разрушения образующихся при хранении комплексов ортованадата. При определении K_m истинную концентрацию MgАТФ рассчитывали по методу А. Фабиато и Ф. Фабиато [47]. Неорганический ортофосфат определяли согласно методу Фиске и Суббароу [48].

АТФ-зависимый транспорт протонов в секреторных везикулах регистрировали при 29° по гашению флуоресценции рН-чувствительного зонда акридинового оранжевого на спектрофлуориметре F2000 («Hitachi», Япония) при длинах волн возбуждения и эмиссии 430 и 530 нм соответственно [8, 9, 42, 43]. Секреторные везикулы (50–100 мкг белка) суспендировали в 1,5 мл буфера, содержавшего 0,6 М сорбит, 100 мМ KCl, 20 мМ KNO₃, 5,0 мМ Na₂АТФ, 2 мкМ акридиновый оранжевый, 20 мМ Hepes-KOH, рН 6,7; после стабилизации флуоресценции (в течение 120–150 с) реакцию начинали добавлением 10,0 мМ MgCl₂.

Сопряжение гидролиза АТФ и транспорта протонов. Для определения уровня сопряжения между транспортом H⁺ и гидролизом АТФ АТФазную активность измеряли при различных концентрациях MgАТФ параллельно с регистрацией

ем транспорта H^+ при тех же концентрациях субстрата. Обе активности измеряли в одинаковых условиях: в 0,1 мл (гидролиз АТФ) или 1,5 мл (H^+ -транспорт) раствора 0,6 М сорбита, 20 мМ НЕРЕС-КОН, рН 6,7, 100 мМ КСl, 20 мМ KNO_3 , содержавшего 0,2–3,0 мМ Na_2ATP и 5,2–8,0 мМ $MgCl_2$, при 29° [8, 9, 43]. При определении транспорта H^+ реакционная смесь содержала 2 мкМ акридиновый оранжевый; реакцию начинали добавлением 5,2–8,0 мМ $MgCl_2$. Реакцию гидролиза АТФ проводили в присутствии и в отсутствие 100 мкМ Na_3VO_4 , останавливали добавлением 1 мл 1,25%-ной ТХУ; неорганический фосфат измеряли, как описано Фиске и Суббароу [48].

Определение белка. Белок определяли модифицированным методом Лоури [49], используя БСА в качестве стандарта; к стандарту добавляли аликвоты соответствующего буфера, в котором ресуспендировали секреторные везикулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор аминокислотных остатков для исследования. Петля L5–6 между трансмембранными сегментами M5 и M6 — один из пяти коротких экстрацитозольных участков, соединяющих друг с другом соседние трансмембранные сег-

менты; вместе с этими сегментами она образует так называемую шпильку M5–M6 (рис. 1), играющую важную роль в транспорте катионов [39–41]. Согласно индексу гидрофобности [50] в Pma1 АТФазе *S. cerevisiae* эта петля состоит из семи аминокислотных остатков, три из которых Asp: 714-DNSLDID. Ранее было показано, что в составе сегментов M5 и M6 находятся аминокислотные остатки, замена которых вызывает нарушение биогенеза и/или приводит к потере активности Pma1 АТФазы [8, 24, 25]. При этом N-концевая часть сегмента M6 Pma1 АТФазы содержит семь расположенных практически один за другим аминокислотных остатков 721-LI.FI.IF.D [25], замена которых нарушала биогенез и/или функционирование фермента вплоть до потери активности (рис. 2); замена еще одного остатка в этом ряду (мутация A726S) приводила к снижению степени сопряженности гидролиза АТФ и транспорта H^+ вдвое, а другого (мутация V723A) — к многократному изменению кинетических параметров, связанных со сдвигом в конформацию E1 [25]. В C-концевой части M5 остатков, замена которых приводила к нарушению биогенеза и/или активности фермента, всего два [23], однако точечная замена семи остатков в этой части вызывала значительное (вдвое и более) уменьшение сопряжения H^+ -насоса [8; В.В. Петров, неопубликованные

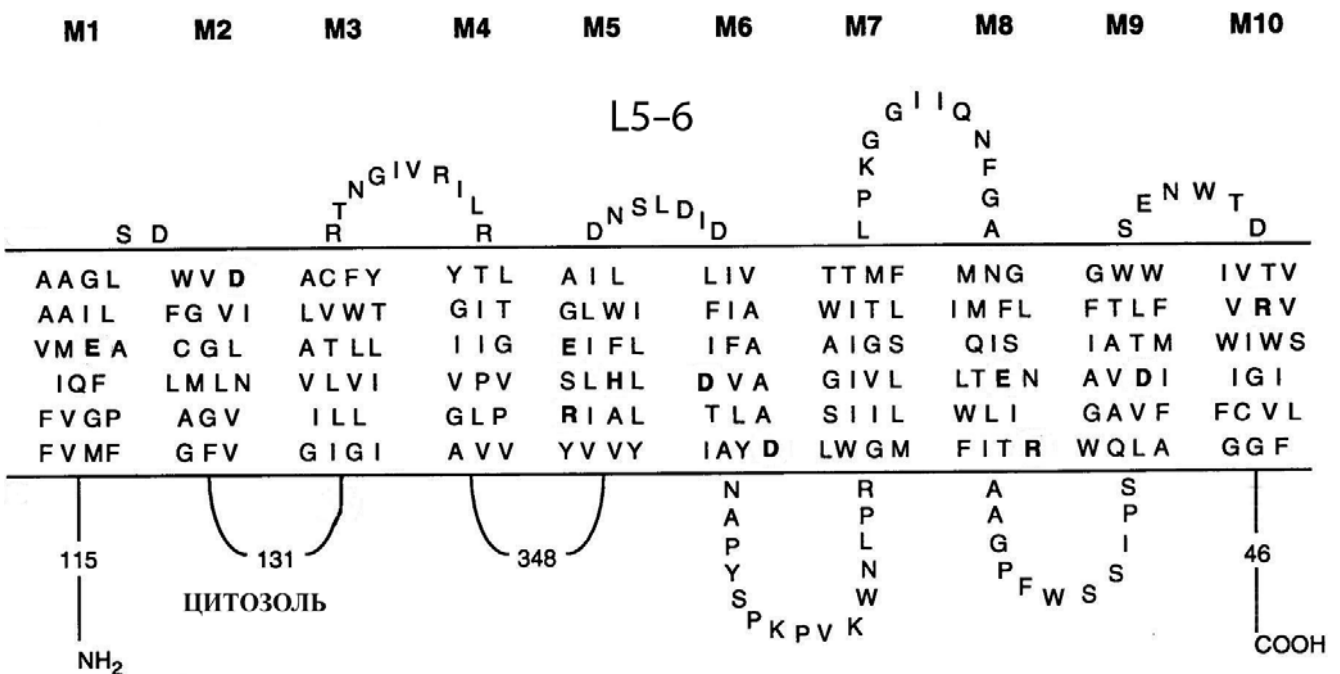
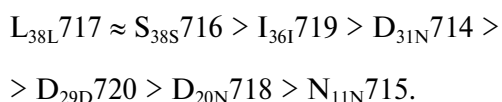


Рис. 1. Схематическая топология Pma1 H^+ -АТФазы дрожжей *S. cerevisiae*, показывающая трансмембранные сегменты и экстрацитозольные петли; отмечена петля L5–6. Цифры обозначают количество аминокислотных остатков в цитозольных частях фермента. Общее количество остатков в Pma1 H^+ -АТФазе *S. cerevisiae* составляет 918

данные]. Таким образом, представлялось важным изучить роль петли L5–6, соединяющей C-концевую часть сегмента M5 и N-концевую часть сегмента M6.

Консервативность изучаемых аминокислотных остатков. Даже в близкородственных Pma АТФазах сахаромыцетов ни один из остатков, образующих петлю L5–6, не является строго консервативным, однако в целом гомология замещающих остатков в опубликованных аминокислотных последовательностях протонных насосов очень высока, составляя 95–100% для всех остатков, за исключением Asn-715, где она составляла 53% (рис. 3). В целом высока была и идентичность: 100% для Ser-716 и Leu-717, 95% для Ile-719 (36 Ile/2 Val), 82% для Asp-714 (31 Asn/7 Asp), 76% для Asp-720 (29 Asp/4 Asn/3 Glu), 53% для Asp-718 (20 Asn/16 Asp/1 Glu), – снижаясь, однако, до 29% в случае Asn-715 (11 Asn/5 Gln/4 Glu). Среди этих остатков наиболее консервативным является Leu-717, учитывая его присутствие и в других аминокислотных последовательностях Pma АТФаз аскомицетов (рис. 3), а наименее – Asp-715, представленный одиннадцатью остатками Asn, пятью Glu, четырьмя Gln и даже двенадцатью His и шестью Arg.

В соответствии с этими данными остатки в петле L5–6 могут быть расположены в следующем порядке, учитывающем наиболее часто встречающийся остаток (подстрочная цифра после буквы, именуемой остаток, указывает количество данного остатка в 38 последовательностях, а буква после цифры – наиболее часто встречающийся в этом положении остаток):



Логично предположить, что консервативность того или иного остатка будет коррелировать с его ролью в структурно-функциональной организации H⁺-АТФазы.

Получение и экспрессирование мутантов в секреторных везикулах. С помощью аланин- и цистеин-сканирующего мутагенеза были последовательно получены точечные замены аминокислотных остатков в петле L5–6 Pma1 H⁺-АТФазы дрожжей *S. cerevisiae*. Для этого были сконструированы олигонуклеотиды с заменами кодонов соответствующих аминокислотных остатков на кодоны Ala и Cys (табл. 1) согласно частоте встречаемости кодонов в H⁺-АТФазе плазматической мембраны дрожжей [51]. Затем с помощью сайт-направленного мутагенеза были получены фрагменты BglII-SalI (519 п.н.) гена *pma1*, несущие мутации. Эти фрагменты были

клонированы в ген *pma1*, после чего ген был встроен в центромерную плазмиду YCp2HSE под контроль промотора HSE, активируемого тепловым шоком. Эту плазмиду затем использовали для трансформации клеток *S. cerevisiae* штамма SY4, где хромосомная копия гена *PMA1* находилась под контролем промотора GAL1 [42]. Дрожжи выращивали при 23° на среде с галактозой до середины логарифмической фазы роста, при этом с хромосомного гена *PMA1* синтезировался фермент дикого типа. Когда клетки перенесли на среду с глюкозой, синтез с гена *PMA1* останавливался, а когда температуру повышали до 39°, синтез фермента начинался с плазмидного гена *pma1* (кодирующего дикий или мутантный тип АТФазы). Штамм SY4 также

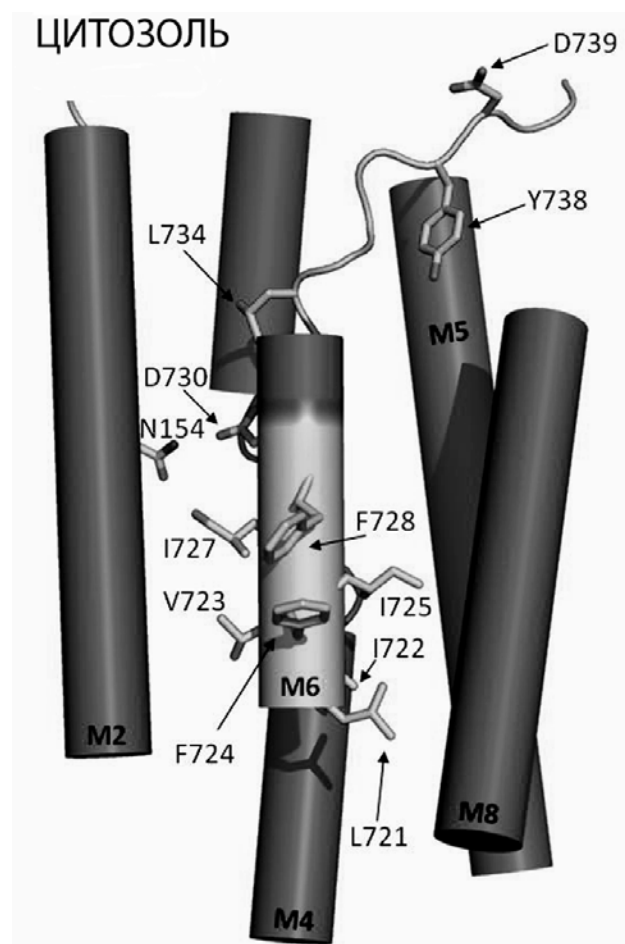


Рис. 2. Аминокислотные остатки в мембранном сегменте M6 Pma1 АТФазы дрожжей, важные для биогенеза и функционирования фермента. Более светлая часть представляет N-конец M6. Не показан Ala-726, замена которого на Ser приводит к двукратному снижению степени сопряжения гидролиза АТФ и транспорта H⁺ [25]. Приведена модифицированная версия рисунка, опубликованного ранее [25]

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Pma1)	714-DNSLDDID
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Pma2)	743-NNSLDIN
<i>Saccharomyces uvarum</i>	712-DNSLDDID
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	712-DNSLNID
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	712-DNSLNID
<i>Saccharomyces arboricola</i>	713-DNSLNID
<i>Saccharomyces bayanus</i>	712-DNSLNID
<i>Saccharomyces eubayanus</i>	711-DNSLNID
<i>Naumovozyma dairensis</i>	714-NNSLNID
<i>Kluyveromyces lactis</i>	695-NRSLNID
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	695-NQSLNID
<i>Kazakhstania naganishii</i>	696-NQSLNID
<i>Kazakhstania africana</i>	696-NHSLDIN
<i>Lachancea thermotolerans</i>	697-NNSLDDID
<i>Millerozyma farinosa</i>	693-NNSLEID
<i>Pichia angusta</i>	693-NESLNID
<i>Ogateae parapolyomorpha</i>	693-NESLNID
<i>Pichia stipitis</i>	699-NRSLNID
<i>Komagatoella pastoris</i>	692-NRSLNID
<i>Candida dubliniensis</i>	691-NRSLDIN
<i>Candida glabrata</i> (Pma1)	705-NHSLDIE
<i>Candida glabrata</i> (Pma2)	697-NHSLDIE
<i>Candida orthopsilosis</i>	695-NHSLNID
<i>Candida parapsilosis</i>	694-NHSLNID
<i>Candida albicans</i>	691-NRSLDIN
<i>Yarrowia lipolytica</i>	714-NESLDDID
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	703-NHSLDDID
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	716-NHSLDDID
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	720-NHSLDDID
<i>Tetrapisispora blattae</i> (Pma1)	710-NHSLDDID
<i>Tetrapisispora blattae</i> (Pma2)	712-NHSLDDID
<i>Tetrapisispora phaffii</i>	702-NHSLDDID
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	694-NESLNID
<i>Debaryomyces hansenii</i>	692-NQSLSID
<i>Spathaspora passalidarum</i>	691-NRSLNID
<i>Torulospora delbrueckii</i>	702-NHSLNIE
<i>Ashbya gossipii</i> (Pma1)	702-NQSLNVH
<i>Ashbya gossipii</i> (Pma2)	695-NQSLNVH
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	712-RNQLNLE
<i>Neurospora crassa</i>	714-NRSLNIE
<i>Aspergillus flavus</i>	625-EETIRAD

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей экстрацитозольной петли L5–6 Pma H⁺-АТФаз сахаромикетов. Приведены также аналогичные последовательности трех аскомицетов – дрожжей *S. pombe* и грибов *N. crassa* и *A. flavus*. Аминокислотные остатки Pma1 *S. cerevisiae* и идентичные им остатки в других H⁺-насосах выделены темно-серым и жирным шрифтом, гомологичные им остатки выделены светло-серым

Таблица 1. Олигонуклеотиды, синтезированные для замены аминокислотных остатков в домене, соединяющем сегменты M5 и M6 Pma1 АТФазы, на Ala, Cys, Glu и Asn

Мутация	Олигонуклеотид
D714A	5'-C CAA AGA GTT AGC CAA AAT AGC-3'
D714C	5'-C CAA AGA GTT ACA CAA AAT AGC-3'
D714E	5'-C CAA AGA GTT TTC CAA AAT AGC-3'
D714N	5'-C CAA AGA GTT GTT CAA AAT AGC-3'
N715A	5'-C CAA AGA AGC ATC CAA AAT AGC-3'
N715C	5'-C CAA AGA ACA ATC CAA AAT AGC-3'
S716A	5'-C AAT GTC CAA AGC GTT ATC C-3'
S716C	5'-C AAT GTC CAA ACA GTT ATC C-3'
L717A	5'-C AAT GTC AGC AGA GTT ATC C-3'
L717C	5'-C AAT GTC ACA AGA GTT ATC C-3'
D718A	5'-C AAT CAA ATC AAT AGC CAA AG-3'
D718C	5'-C AAT CAA ATC AAT ACA CAA AG-3'
I719A	5'-C AAT CAA ATC AGC GTC CAA AG-3'
I719C	5'-C AAT CAA ATC ACA GTC CAA AG-3'
D720A	5'-C AAT CAA AGC AAT GTC CAA AG-3'
D720C	5'-C AAT CAA ACA AAT GTC CAA AG-3'
D720E	5'-C AAT CAA TTC AAT GTC CAA AG-3'
D720N	5'-C AAT CAA GTT AAT GTC CAA AG-3'

Примечание. Жирным шрифтом выделены триплеты, кодирующие замены.

содержал температурно-чувствительную мутацию *sec6-4*, блокирующую слияние секреторных везикул с плазматической мембраной, поэтому повышение температуры до 39° приводило к накоплению секреторных везикул, содержащих фермент, вновь синтезированный с плазмидного гена *pma1* [42]. В качестве контроля на присутствие в препарате секреторных везикул плазматических мембран, несущих АТФазу дикого типа, синтезированную с хромосомного гена, использовали везикулы, выделенные из штамма, несущего плазмиду YCr2HSE без гена *pma1* ($\Delta pma1$, табл. 2). Таким образом, использование клеток штамма SY4 позволяло получать секреторные везикулы, как несущие молекулы фермента (независимо от активности), так и практически не содержащие молекул АТФазы [27, 42]. В последнем случае для выявления синтеза фермента использовали метаболическое мечение (см. ниже).

Секреторные везикулы, практически свободные от примеси плазматических мембран (4%, $\Delta pma1$, табл. 2), выделяли с помощью дифференциального центрифугирования и гель-фильтрации или центрифугирования в градиенте плотности сахарозы и определяли уровень экспрессии фермента и его активность. Протон-

ный транспорт в секреторные везикулы регистрировали по гашению флуоресценции рН-чувствительного красителя акридинового оранжевого, как описано ранее [8, 9, 42, 43]. Для оценки степени сопряжения гидролиза АТФ с транспортом H⁺ проводили параллельные измерения АТФазной активности и гашения флуоресценции в одинаковых условиях, но при различных концентрациях MgАТФ.

В случае Asp-714 и Asp-720 были получены также замены этих остатков на Asn и Glu (см. ниже), изучение которых проводилось по вышеуказанной схеме.

Мутанты, несущие замены аминокислотных остатков на аланин: экспрессия и гидролиз АТФ. Pma1 H⁺-АТФаза синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме и в процессе созревания последовательно проходит через аппарат Гольджи и секреторные везикулы, которые доставляют фермент к плазматической мембране. На этих стадиях имеются по крайней мере два пункта «контроля качества», и если фермент имеет серьезные дефекты фолдинга, он отбраковывается [52–54].

В соответствии со степенью консервативности остатков из семи мутаций, вызванных за-

мещением на Ala, только замена наиболее консервативного остатка (L717A) приводила к полному блокированию трафика вновь синтезированной АТРаза, что предотвращало достижение ею секреторных везикул (табл. 2). Такое поведение типично для белка с серьезными дефектами фолдинга, что приводило в действие механизмы контроля качества, вызывая задержание дефектного белка в эндоплазматическом ретикулуме [53].

Для обнаружения синтеза мутантных АТРаза, не способных достичь секреторных везикул,

клетки SY4 переносили с галактозой на глюкозную среду, как описано выше, и метили, инкубируя с [³⁵S]-метионином. Затем выделяли суммарную мембранную фракцию, которую обрабатывали трипсином в соотношении трипсин : белок 1 : 20, подвергали Ds-Na-ПААГ-электрофорезу, проводили иммунопреципитацию с поликлональными антителами против Pma1 и обрабатывали, как описано Накамото с соавт. [46]. По чувствительности белка к трипсину можно было судить о нарушении фолдинга. Действительно, в отличие от фермента дикого типа, 100-кДа

Таблица 2. Влияние точечных мутаций в петле L5–6 на экспрессию Pma1 АТРаза в секреторных везикулах, гидролиз АТРа и H⁺-транспорт¹

Штамм	Экспрессия, %	Гидролиз АТРа				H ⁺ -транспорт	
		%	K _m , мМ	K _i , мкМ	pH-оптимум	%	коэффициент сопряжения
Дикий ²	100	100	1,3	2,7	5,7	100	1,00
Δpma1 ³	4	4	—	—	—	—	—
D714A	23	11	—	—	—	—	—
D714C	0	4	—	—	—	—	—
D714E	12	7	—	—	—	—	—
D714N	67	97	0,9	3,3	5,7	82	0,94
N715A	68	71	0,6	1,2	5,6	70	0,85
N715C	88	58	1,6	1,0	5,6	88	0,84
S716A	71	60	0,5	1,2	5,7	58	0,79
S716C	95	101	1,0	1,0	5,6	81	0,91
L717A	3	9	—	—	—	—	—
L717C	0	4	—	—	—	—	—
D718A	79	104	1,1	3,7	5,7	88	0,94
D718C	84	108	2,8	1,1	5,6	81	0,92
I719A	34	35	1,0	2,0	5,7	31	0,29
I719C	85	105	1,2	1,0	5,6	87	0,90
D720A	65	47	0,7	5,5	5,6	34	0,65
D720C	85	80	0,5	1,9	5,5	62	0,68
D720E	61	87	0,7	3,5	5,5	54	0,85
D720N	72	88	0,9	3,7	5,6	67	0,89

¹ Специфическая экспрессия 100 кДа-субъединицы АТРаза определялась количественным иммуноблоттингом (см. «Методы исследования») и представлена как процент от экспрессии фермента дикого штамма, выделяемого параллельно. Гидролиз АТРа определяли при pH 5,7. 100% соответствовали $4,77 \pm 0,68$ мкмоль P_i/мин (E) на 1 мг белка. K_m измерялась в мМ АТРа, K_i — в мкМ ортованадата натрия. Для определения H⁺-транспорта использовали гашение флуоресценции акридинового оранжевого, выражаемого в процентах (% F), как описано в разделе «Методы исследования». Коэффициент сопряжения рассчитывали как функцию скорости H⁺-транспорта от скорости гидролиза АТРа. 100% соответствовали $743 \pm 88\%$ F на 1 мг белка. Процент гашения флуоресценции (% F) измеряли как соотношение гашения флуоресценции (ΔF) к ее максимальному уровню (F_{max}). Представлены средние данные из 17–26 опытов для фермента дикого типа и 2–9 — для мутантов.

² Секреторные везикулы выделяли из клеток, несущих экспрессионную плазмиду YCr2HSE-PMA1 с геном *pma1* дикого типа (положительный контроль).

³ Секреторные везикулы выделяли из клеток, несущих экспрессионную плазмиду YCr2HSE без гена *pma1* (отрицательный контроль).

субъединица которого после отщепления небольшого фрагмента превращалась в форму с $M_r = 97$ кДа и оставалась стабильной в течение по крайней мере 10 мин (рис. 4), мутантная L717A АТРаза теряла стабильность уже в течение 0,5 мин, что указывало на серьезные дефекты фолдинга и приводило к изменению экспонирования сайтов, доступных для действия трипсина. При этом гидролизовались и 100-, и 97-кДа формы мутантного фермента.

Уровень экспрессии мутантного фермента в секреторных везикулах после другой замены (D714A) был незначителен, но заметен (23%, табл. 2), однако мутантный фермент обладал очень низкой фосфогидролазной активностью (11%), которая, с учетом присутствия в составе выделенного препарата секреторных везикул примеси плазматических мембран (4%, $\Delta pma1$, табл. 2), была еще ниже, что делало невозможным дальнейшее детальное исследование, в частности изучение кинетических характеристик фермента и анализ протонного транспорта. У мутанта I719A имело место значительное (трехкратное) снижение и уровня экспрессии, и активности (табл. 2), тем не менее это позволяло изучить кинетику гидролиза АТР (табл. 2) и транспорт протонов (см. ниже и табл. 2). У остальных полученных мутантов (N715A, S716A, D718A и D720A) уровень экспрессии был существенным (65–79% от уровня экспрессии фермента дикого типа, табл. 2), и они обладали значительной активностью (47–104%), что позволило провести детальные исследования.

Кинетика гидролиза АТР у большей части активных мутантных ферментов мало отличалась от таковой дикого типа; однако в двух случаях (N715A и S716A) наблюдалось более чем двукратное увеличение сродства к MgАТР и чувствительности к специфическому ингибитору Р-АТРаза ортованадату (табл. 2), что можно было бы объяснить изменением равновесия между конформационными состояниями E1 и E2 [52]. Правда, эти изменения не столь существенны, чтобы объяснить их значительным сдвигом в конформационном состоянии фермента.

Мутанты, несущие замены аминокислотных остатков на цистеин: экспрессия и гидролиз АТР. Следующим шагом было использование Су-сканирующего мутагена, чтобы последовательно заменить все остатки в петле L5–6 на Суs так же, как это было сделано для мутаций, несущих замены аминокислотных остатков на аланин (табл. 1). Поскольку цистеиновые остатки обладают высокой реакционной способностью, это позволило бы в дальнейшем использовать полученные мутанты для изучения топологии фермента и конформационных изменений во

время реакционного цикла с помощью избирательного мечення введенных остатков Суs сульфгидрильными радиоактивными, флуоресцентными или спин-реагентами [43, 44, 55, 56]. Как видно из табл. 2, результат замен аминокислотных остатков на цистеин в сравнении с заменами на аланин был практически идентичен только в случае мутанта D718С. Мутант N715С показал сходные, но не идентичные результаты: его экспрессия была выше на треть по сравнению с заменой на Ala, однако АТРаза обладала несколько меньшей активностью.

Напротив, замены D714С и I717С были еще более чувствительны для клетки, чем D714А и I717А: биогенез этих мутантных ферментов был полностью заблокирован на его ранних стадиях, предотвращая попадание мутантных белков в секреторные везикулы. Метаболическое мечення и ограниченный трипсинолиз показали, что их чувствительность к трипсину была такой же, как и в случае замены аланином (рис. 4): АТРаза D714С обнаруживала сходные с D714А фрагменты, а мутантный фермент I717С расщеплялся трипсином уже в течение первых 0,5 мин его действия, точно так же, как мутантный фермент L717А (рис. 4).

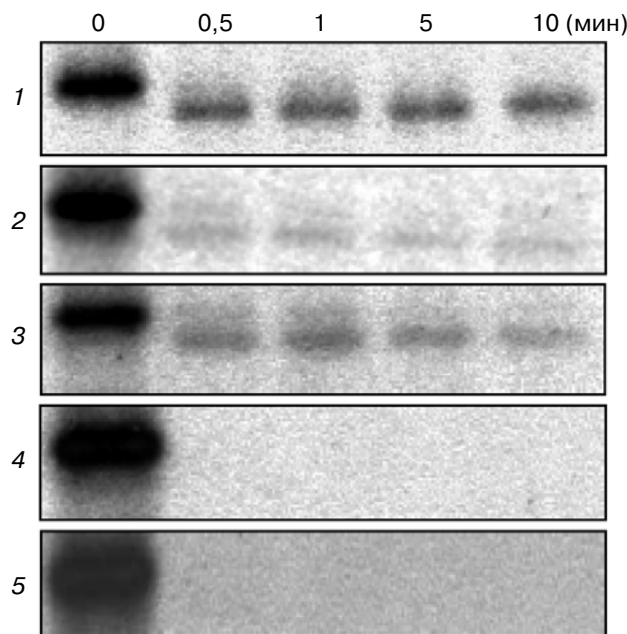


Рис. 4. Ограниченный трипсинолиз АТРаза дикого типа и мутантных АТРаза. Суммарные фракции мембран, выделенных из клеток, экспрессировавших ферменты дикого типа (1), D714A (2), D714E (3), L717A (4) и L717C (5), инкубировали с трипсином в соотношении трипсин : белок 1 : 20 в течение 0, 0,5, 1, 5 и 10 мин

Наконец, мутантные формы фермента S716C, D720C и, особенно, I719C имели более высокий уровень экспрессии по сравнению с Ala-заменами (S716C и D720C – на 30%, а I719C – даже в 2,5 раза) и на 70% (S716C и D720C) или даже в 3 раза (I719C) более высокую активность по сравнению с Ala-заменами (табл. 2). В случае S716C это, вероятно, объясняется стереохимическим сходством сериновых и цистеиновых остатков, что нашло отражение в том, что параметры, характеризующие уровень экспрессии, активность и кинетику гидролиза АТР, у мутантного фермента практически не отличались от таковых фермента дикого типа.

При этом кинетика гидролиза АТР у мутантных ферментов с Ala- и Cys-заменами аминокислотных остатков петли L5–6 отличалась в пяти случаях: Asn-715 и Ser-716 (K_m), Asp-718 (K_m и K_i), Ile-719 и Asp-720 (K_i) (табл. 2), но в целом наблюдаемые изменения были незначительны, что, видимо, исключает возможность выраженных конформационных сдвигов, обусловленных точечными Cys-мутациями, как и в случае замен этих остатков на Ala.

Дополнительные замены остатков Asp-714 и Asp-720. Кроме изоформы Pma1 у *S. cerevisiae* и некоторых других дрожжей и грибов имеется менее активная и слабо экспрессируемая изоформа Pma2, на 89% идентичная Pma1 в случае *S. cerevisiae* [57]. Аминокислотные последовательности петли L5–6 этих изоформ на 100% гомологичны, но идентичность составляет только 71%: на месте Asp-714 и Asp-720 в Pma2 находятся остатки Asn (рис. 3). Для лучшего понимания роли петли L5–6 и образующих ее индивидуальных аминокислотных остатков были сделаны дополнительные замены Asp-714 и Asp-720 на остатки Asn и Glu (последние найдены в составе соответствующих последовательностей у аскомицетов, например, у *Aspergillus flavus*). Анализ последствий дополнительных замен Asp-714 показал, что только у мутанта D714N были восстановлены биогенез и активность фермента (табл. 2), в то время как в мутантных формах фермента, где Asp заменен на гомологичный Glu (D714E) или на неконсервативные Ala (D714A) или Cys (D714C), был серьезно нарушен биогенез АТРазы. Фермент с заменой D714E обладал такой же чувствительностью к трипсину, что и D714A (рис. 4) и D714C (данные не приведены), свидетельствуя о серьезных нарушениях фолдинга фермента.

Обе замены остатка Asp-720 на гомологичные Asn или Glu (D720N и D720E) почти в 2 раза увеличивали активность фермента в сравнении с D720A без изменения уровня экспрессии. В то же время неконсервативная замена D720C

увеличивала экспрессию на 20–40% по сравнению с D720N и D720E без изменения активности фермента. При этом кинетика гидролиза АТР у мутантного фермента D714N была близка к таковой у фермента дикого типа, а у ферментов с заменами Asp-720 незначительно отличалась друг от друга и от дикого типа (табл. 2). Наименьшие отличия и в этом случае наблюдались у D720N.

Транспорт протонов и его сопряжение с гидролизом АТР. Учитывая вклад сегментов M5 и M6 в формирование сайтов транспорта катионов у P2-АТРаз и их подвижность во время реакционного цикла, представляло особый интерес выяснить, влияют ли полученные мутации в петле L5–6, соединяющей эти сегменты, на транспорт H^+ и его сопряжение с гидролизом АТР. Тринадцать активных мутантных ферментов были далее использованы для определения их способности поддерживать АТР-зависимый транспорт H^+ . Для этой цели исследовали АТР-зависимое гашение флуоресценции акридинового оранжевого (табл. 2, рис. 5). Видно, что в целом уровень транспорта H^+ у мутантных ферментов с заменами на Ala и Cys был одинаков или несущественно ниже, чем гидролиз АТР, за исключением замен остатка Asp-720, где уровень транспорта H^+ был ниже уровня гидролиза АТР.

Для более детального изучения и с целью определения степени сопряженности фермента данное гашение регистрировали при различных концентрациях MgАТР (рис. 5), параллельно при тех же концентрациях и в тех же условиях

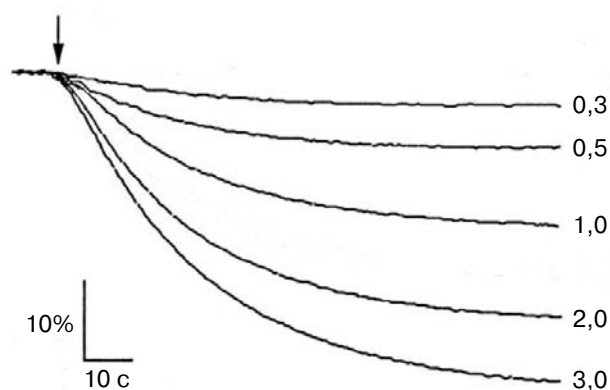


Рис. 5. Гашение флуоресценции акридинового оранжевого при различных концентрациях MgАТР как индикатор H^+ -транспорта в секреторные везикулы ферментом дикого типа. Цифрами указана концентрация АТР (мМ), стрелкой – внесение $MgCl_2$ в концентрациях, превышающих концентрацию АТР на 5 мМ. Процент гашения флуоресценции (% F) измеряли как соотношение гашения флуоресценции (ΔF) к ее максимальному уровню (F_{max})

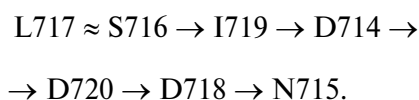
измеряя фосфогидролазную активность. Поскольку при повышении концентрации MgATP гашение флуоресценции теряет линейность (рис. 5), что связано с взаимодействием зонда с белком и MgATP [58], использовали концентрации АТФ, не превышающие 2 мМ. Затем был построен график зависимости транспорта H⁺ от гидролиза АТФ при различных концентрациях MgATP (рис. 6). Во всех случаях наблюдалась линейная зависимость, как можно было бы ожидать, если стехиометрия протонного транспорта остается неизменной при всех скоростях работы протонного насоса. Коэффициент сопряжения у фермента дикого типа составлял 1,00, а у большинства мутантов – 0,79–0,94 (табл. 2). Меньшим на треть (0,65–0,68, табл. 2, рис. 6) был коэффициент сопряжения у АТФаз с неконсервативными заменами Asp-720 (D720A и D720C), в случае же консервативных замен (D720E и D720N) он мало отличался от такового фермента дикого типа (табл. 2, рис. 6).

Однако у мутанта I719A уровень сопряжения были существенно ниже (0,29), чем у фермента дикого типа, что соответствовало трехкратному снижению уровня протонного транспорта, указывая на значительное, но не полное разобщение между гидролизом АТФ и транспортом H⁺ (табл. 2, рис. 6). В то же время у мутанта I719C уровень сопряжения был близок к таковому фермента дикого типа. Следует, однако, отметить, что не наблюдается прямой зависимости между уровнем гидролиза АТФ и протонного

транспорта и коэффициентом сопряжения. Мутантные ферменты с низким уровнем гидролиза АТФ и транспорта H⁺ могут быть прекрасно сопряжены (L797A в M8 сегменте [9]) и наоборот (E803N и E803A в M8 сегменте [8, 9]), равно как и повышенный уровень протонного транспорта по сравнению с гидролизом АТФ (например, у мутанта V723A в сегменте M6) не всегда является свидетельством сверхсопряжения протонного насоса [25].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Консервативность остатка, структура и функционирование фермента. Как отмечено выше, аминокислотные остатки в петле L5–6 в силу своей консервативности могут быть расположены в следующем порядке, учитывающем гомологичность остатков в Pma1 H⁺-АТФазы дрожжей *S. cerevisiae* в сравнении с остатками в известных последовательностях сахаромитозов:



Логично было бы ожидать прямую зависимость между степенью консервативности остатка и влиянием, вызываемым его заменой, на структуру, функцию и биогенез фермента. Действительно, замена наиболее консервативного из ос-

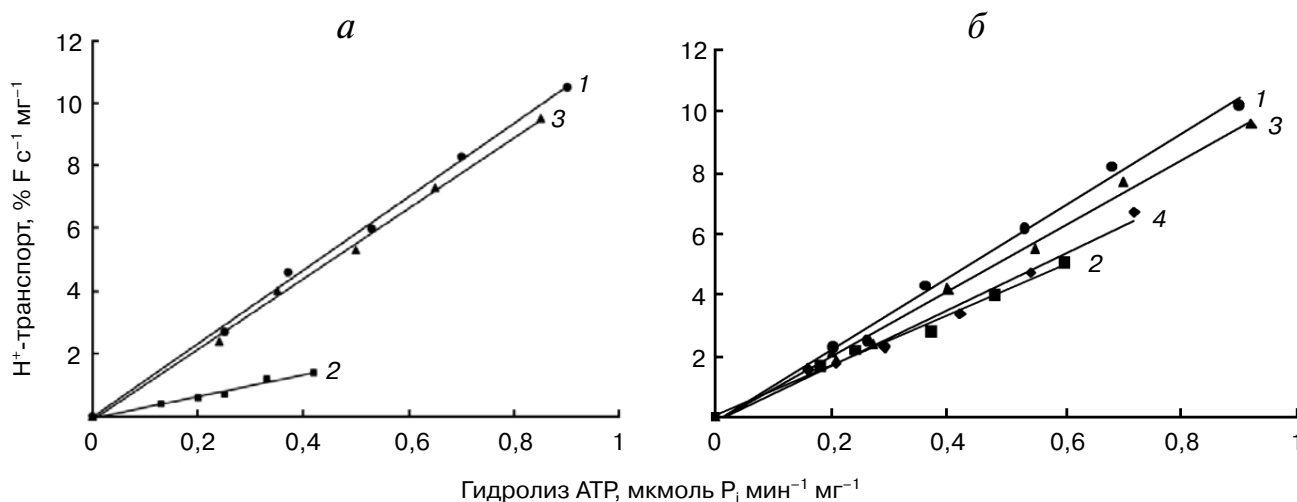


Рис. 6. Сопряжение H⁺-транспорта и гидролиза АТФ ферментами дикого типа (1) и с заменами остатков Пе-719 (а) – I719A (2) и I719C (3) и Asp-720 (б) – D720A (2), D720N (3) и D720C (4). Начальные скорости H⁺-транспорта определяли при концентрациях АТФ 0,2–2,0 мМ, после чего строили график зависимости H⁺-транспорта от ванадат-чувствительной активности Pma1 АТФазы (гидролиз АТФ), измеренной при тех же условиях. Детали – в разделе «Методы исследования» и в подписи к рис. 5

татков Leu-717 (38 Leu в 38 аминокислотных последовательностях Pma АТРаз сахаромикетов, рис. 3) вызывала наиболее драматические изменения в экспрессии и активности фермента, приводя к блокированию биогенеза и потере активности, в то время как замена наименее консервативного Asn-715 вызывала наименьшие отклонения (табл. 2).

Однако консервативность того или иного аминокислотного остатка не всегда однозначно предопределяет его роль в структурно-функциональной организации фермента. Так, замена остатка Ser-716, такого же по степени консервативности среди сахаромикетов, как и остатка Leu-717, на Ala приводила к незначительному (на 30–40%) снижению экспрессии, активности и транспорта протонов и еще менее выраженному влиянию на сопряжение транспорта протонов с гидролизом АТФ; замена же этого остатка на Cys и вовсе не оказывала существенного влияния на характеристики фермента. Замена на Ala следующего по степени консервативности остатка, Ile-719 (36 Ile/2 Val), вызывала значительное (троекратное) снижение экспрессии, скорости гидролиза АТФ, транспорта протонов и его сопряжения, в то время как его замена на Cys не приводила к сколь-либо существенным изменениям. Вместе с тем замена находящегося на четвертом месте в ряду степени консервативности Asp-714, представленного в основном остатками Asn (31 Asn/7 Asp), на Ala, Cys и даже Glu вызывала или значительное снижение экспрессии (Asp-714 → Glu/Ala) при еще большем уменьшении активности, или полное блокирование биогенеза мутантных ферментов (Asp-714 → Cys). Изменения, вызываемые заменами следующих в ряду степени консервативности остатков (Asp-720, близкого по консервативности Asp-714, и, особенно, Asp-718), были незначительными, за исключением неконсервативной замены Asp-720 → Ala, которая понижала не только активность фермента, но и его экспрессию, а также максимально снижала степень сопряженности фермента. Наконец, замена наименее консервативного остатка, Asn-715, на Ala снижала экспрессию фермента и его активность на треть; при замене на Cys экспрессия фермента не менялась, а активность снижалась на 40%. При этом главный показатель нормального функционирования фермента — сопряжение гидролиза АТФ с транспортом H^+ — у этих мутантных форм был одинаков и близок к таковому фермента дикого типа.

Следует также отметить, что Ala-сканирующий мутагенез считается традиционным подходом при замене аминокислотных остатков, наименее нарушающим структуру белка [59]. В нашем случае, однако, оказалось, что замены трех

остатков, Ser-716, Ile-719 и Asp-720, на Cys приводили к меньшему нарушению структуры и функции фермента по сравнению с заменами тех же остатков на Ala (в случае S716C, очевидно, из-за стереохимической близости Ser и Cys), а в двух других случаях (Asn-715 и Asp-718) результаты замен на Ala или Cys были очень близки.

Роль заряженных остатков Asp-714, Asp-718 и Asp-720. Наряду с результатами, полученными при замене остатка Leu-717, наиболее интересными представляются данные, полученные при замене заряженных остатков Asp, находящихся в петле L5–6: Asp-714, Asp-718 и Asp-720, которые занимают четвертое–шестое места в ряду по степени консервативности. Заряженные аминокислотные остатки обладают большей реакционной способностью по сравнению с нейтральными, поэтому логично было бы ожидать более выраженный эффект замен этих остатков на нейтральный аланин или полярный цистеин. Наименее консервативен из этих остатков Asp-718, в большинстве известных последовательностей АТРаз сахаромикетов почти поровну представленный остатками Asn и Asp (20 Asn /16 Asp/1 Glu/1 Ser, рис. 3). Его замены на Ala или Cys не вызывали существенных изменений в биогенезе и активности фермента, а получение замен Asp-718 на Asn или Glu, как в случае Asp-714 и Asp-720, и дальнейшее изучение роли этого остатка не представляли интереса.

Asp-714, так же, как и Asp-718, в основном представлен Asn (31 Asn/7 Asp), однако замена этого остатка приводила к совершенно различным результатам по сравнению с Asp-718: для Asp-714 все замены, включая строго консервативную D714E, кроме также консервативной D714N, вызывали полное блокирование биогенеза или его существенное нарушение. Результаты замен Asp-720 (29 Asp/4 Asn/3 Glu/2 His), степень гомологичности которого была близкой к Asp-718, были промежуточными по эффекту, но скорее напоминали замены Asp-718. Такое различие в последствиях замен одинаковых по химической природе (и близких по степени гомологичности) остатков связано, видимо, с их положением во вторичной и третичной структуре белка, иначе говоря — с микроокружением остатка и его взаимодействием с соседними остатками, а также с липидной и водной фазами, что может нарушать структурную организацию и стехиометрию аминокислотных остатков и, соответственно, фолдинг белка, как было предположено Митталом с соавт. [60, 61]. Так, первый из аспартатных остатков, Asp-714, находится на границе гидрофобной и гидрофильной фаз, и со стороны мембраны к нему примыкают нейтральные остатки 713-LIAI, а со стороны

клеточной стенки – полярные 715-NS, обращенные в гидрофильную фазу (рис. 1). Следующий аспаратный остаток окружен нейтральными Leu-717 и Ile-719, но в непосредственной близости к нему находятся полярные Asn-715 и Ser-716 и отрицательно заряженные Asp-714 и Asp-720. Наконец, Asp-720 с одной стороны отделен от Asp-718 остатком Ile, а с другой – находится на границе водной и мембранной фаз, где к нему примыкают 721-LIVFI (рис. 1 и 2), находящиеся в мембране, замены которых на Ala вызывают серьезные нарушения функционирования фермента [24, 25].

Однако замены остатков Asp-718 и Asp-720, которые тоже должны были изменить стехиометрию аминокислотных остатков, приводили к гораздо менее значительным эффектам по сравнению с заменами Asp-714→Ala (Glu/Cys). Такое различие объясняется, возможно, тем, что в трехмерной структуре Asp-714 может находиться в непосредственной близости от остатков с положительным зарядом, например Arg-320 или Arg-323 во второй (L3–4) или Lys-781 в четвертой (L7–8) экстрацитозольных петлях (рис. 1), что должно было бы нейтрализовать заряд и стабилизировать белок, как это было предположено нами ранее для Asp-739 [25]. Действительно, в трехмерной модели, построенной для Na⁺,K⁺-АТФазы, вторая и четвертая экстрацитозольные петли находятся рядом [35]. Анализ данных, полученных для D714E и D714N, исключает наличие сильной ионной (солевой) связи, но предполагает, однако, что такая связь (в случае замены D714N) может быть или слабой ионной, или водородной, поскольку фермент с заменой D714N мало отличается по своим характеристикам от фермента дикого типа. Следует также учитывать, что Pma1 АТФаза является интегральным трансмембранным белком, который взаимодействует с липидным бислоем; очевидно, замена даже одного остатка может вызвать изменения во взаимодействии молекулы фермента с липидами мембраны и/или водной фазой, вызывая драматические изменения в его биогенезе и функционировании (например, результаты замены остатков Asp-714 и Leu-717 в представленном исследовании). Более того, последствия замен могут зависеть как от условий экспрессии мутантных АТФаз [26, 27], так и от химической природы замены [8, 9, 43, 44].

Так, использующийся в работе тепловой шок мог бы приводить в случае мутаций с нарушением биогенеза к изменению взаимодействия АТФазы с липидным бислоем из-за изменения жидкостности (вязкости) последнего. Такое влияние теплового шока наблюдалось нами ранее в случае мутаций I794A, F796A, Q798A,

I799A в сегменте M8, биосинтез которых был заблокирован вследствие теплового шока [9, 26, 27]. Однако при введении мутантного гена в хромосому и экспрессировании в отсутствие теплового шока в случае I794A и F796A биосинтез восстанавливался, хотя и не на уровне дикого типа, но на уровне, достаточном для поддержания жизнедеятельности [9, 26, 27]. Результаты настоящей работы позволяют предположить, что в данном случае тепловой шок не оказывался критичным, что видно на примере мутаций D714N и D714E – будучи близки стереохимически между собой и с диким типом, они приводили к совершенно разным результатам. Напротив, упомянутый выше мутант Q798A не экспрессировался ни в секреторных везикулах, ни в плазматической мембране, в то время как АТФаза с консервативной заменой этого остатка (Q798E) экспрессировалась в секреторных везикулах на уровне дикого типа [9].

Если сравнить теперь степень консервативности аминокислотных остатков (А) и ее влияние на результаты замен (Б), то порядок окажется другим, существенно отличающимся для остатков Asp-714 и, особенно, Ser-716:

L717 ≈ S716 → I719 → D714 → D720 → D718 → N715, (А)

L717 → D714 → I719 → D720 → S716 ≈ N715 → D718. (Б)

Пространственная организация фермента и механизмы транспорта протонов. Таким образом, по крайней мере два из семи остатков петли L5–6, очевидно, являются важными для биогенеза, структуры и функционирования Pma1 H⁺-АТФазы дрожжей. Leu-717 расположен в середине петли L5–6; поскольку во время реакционного цикла фермент претерпевает существенные конформационные изменения [5], замена этого остатка как меньшим по размеру Ala, так и более стереохимически близким Cys может серьезно изменить подвижность M5 и M6 (скорее всего, и других) трансмембранных сегментов, нарушая, возможно, фолдинг белка, что может вызывать его задержание на «пунктах контроля качества» [53, 54].

Asp-714 также важен для структуры и, особенно, для функционирования фермента; возможно, он играет роль, сходную с ролью Asp-739 в M6 (рис. 1 и 2), который предположительно нейтрализует соседний положительный заряд, таким образом стабилизируя белок [25]. Можно, однако, предположить, что Asp-714 может прямо участвовать в H⁺-транспорте и/или других аспектах функционирования фермента.

Чрезвычайно интересно и то, что у *S. cerevisiae* имеются две изоформы Pma АТФазы: Pma1 и

Pma2, на 89% гомологичные (а в петле L5–6 на 100% гомологичные и на 71% идентичные), первая из которых функционально активна, причем ее функционирование изменяется при росте на глюкозе и других сбраживаемых сахарах [58, 62–64], в то время как Pma2 малоактивна, дормантна и практически не активируется глюкозой [57]. При этом у изоформы Pma2 на месте Asp-714 находится Asn-743 (рис. 3); из всех замен Asp-714 только D714N позволяла получить активный фермент, близкий по характеристике к дикому типу. Замены другого остатка аспарагиновой кислоты, Asp-720, не привели к таким драматическим результатам, однако и в этом случае наиболее близкой к дикому типу оказывалась замена D720N, а не D720E. Так же, как и в случае с Asp-714, в Pma2 на месте Asp-720 находится Asn-749. Таким образом, наличие или заряженного аспартатного, или полярного аспарагинового остатков может влиять на способность фермента реагировать на изменение условий роста, выражающуюся в его активации при сбраживании глюкозы или переходе в малоактивное состояние при голодании [58, 62, 64]. Изменения функционирования фермента происходили также при замене Glu-803 в сегменте M8 на Gln, приводя к изменению стехиометрии транспорта ($H^+ : ATP$) и увеличению числа транспортируемых H^+ (H_3O^+) более чем в 2 раза [8, 9, 27].

Из представленных на рис. 3 опубликованных аминокислотных последовательностей Pma АТРаза изоформы Pma2 найдены пока только у *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *T. blattae* и *A. gossipii*. У трех последних видов аминокислотные последовательности петли L5–6 обеих изоформ на 100% идентичны, отличается только порядковый номер остатков, а на месте Asp-714 находится остаток Asp. Данные о выраженной «глюкозной» активации Pma АТРаза для этих видов отсутствуют, что подтверждает наше предположение о возможном вовлечении петли L5–6 (в первую очередь — за счет остатка Asp-714) в процесс активации фермента при сбраживании глюкозы. Ранее подобное вовлечение в регуляцию фермента было предположено нами для экстрацитозольной петли L9–10, находящейся в непосредственной близости от С-регуляторного конца Pma1 H^+ -АТРаза [65, 66]. Кроме теоретического значения данное заключение важно и для многих биотехнологических производств, эффективность которых связана с функционированием H^+ -АТРаза плазматической мембраны.

Наконец, замена Pe-719 на Ala вызывала существенное нарушение сопряжения фермента одновременно со значительным снижением экспрессии и активности; более мягкий эффект этой замены по сравнению с L717A объясняет-

ся, вероятно, тем, что этот остаток находится между Asp-718 и Asp-720. Замена Leu меньшим по размеру Ala нарушает пространственную организацию фермента, что подтверждают и результаты замены этого остатка полярным, но близким по размеру Cys.

Совместно с мембранными сегментами M4 и M8 сегменты M5 и M6 формируют катион-связывающие сайты в Ca^{2+} -АТРаза саркоплазматического ретикулума и других P2-АТРаза. В SERCA Ca^{2+} -АТРаза таких сайтов два, в образовании которых участвуют аминокислотные остатки в сегментах M4, M5, M6 и M8. В сегменте M5 имеется два аминокислотных остатка, участвующих в формировании сайтов связывания и транспорта Ca^{2+} , это Asn-768, соответствующий Ser-699 в Pma1, и Glu-771, соответствующий Glu-703; оба в сайте I. В сегменте M6 такими остатками являются Thr-799 (сайт I), Asn-796 (сайт II) и Asp-800 (оба сайта) [4, 5, 15–17]. В Pma1 АТРаза этим остаткам соответствуют Ala-729, Ala-726 и Asp-730. Ранее сайт-направленный мутагенез выявил, что замены остатков Glu-703 (E703Q, E703L [8]) и Ala-726 (A726S [24, 25]) приводят к частичному разобщению сопряжения транспорта H^+ и гидролиза АТФ, в то время как замены Asp-730 (D730N и D730V) вызывали блокирование биогенеза фермента, и только консервативная замена D730E частично восстанавливала биогенез (48% экспрессии по сравнению с диким типом, но фермент обладал очень низкой активностью) [8]. Замена S699A не препятствовала биогенезу, но лишала фермент активности [23]. В сегменте M8 Ca^{2+} -АТРаза саркоплазматического ретикулума остатком, участвующим в формировании сайта транспорта Ca^{2+} , является Glu-908 (сайт I), соответствующий Glu-803 Pma1 H^+ -АТРаза [8, 9]. В случае Glu-803 ни одна из замен не приводила к полному блокированию трафика синтезированных *de novo* мутантных АТРаза (у форм E803S и E803L экспрессия, однако, составляла всего 8% от уровня дикого типа), однако эти ферменты оказывались либо неактивными, либо имели существенно измененное сопряжение транспорта H^+ и гидролиза АТФ от почти полного разобщения (E803N, E803A) до более чем двукратного сверхсопряжения (E803Q) [8, 9, 27]. Наконец, в сегменте M4 SERCA Ca^{2+} -АТРаза остатки Val-304, Ala-305, Pe-307 и Glu-309 участвуют в образовании сайта II; в Pma1 АТРаза им соответствуют Pe-331, Pe-332, Val-334 и Val-336. Таким образом, не только заряженные карбоксильные и полярные гидроксильные или амидные группы боковых цепей, но и карбонильные группы основной цепи могут участвовать в связывании и транспорте катионов.

Используя данные по кристаллической структуре H⁺-АТФазы растений [14] и наиболее достоверную трехмерную модель Ca²⁺-АТФазы [5], была построена гомологичная модель сайтов транспорта H⁺ Pma1 АТФазы дрожжей (рис. 7). Кристаллическая структура H⁺-АТФазы растений содержит полость (380 Å³), способную вместить 12 молекул воды [14], что предполагает, что в ней могут поместиться по крайней мере две гидратированные молекулы гидроксония [25]. Сравнительное гомологичное моделирование с использованием трехмерной модели Ca²⁺-АТФазы также показывает, что в дрожжевом ферменте имеются два сайта связывания ионов гидроксония [25], и что транспортируется именно он [8, 9, 25]. Полученные данные позволяют постулировать, что в отличие от имеющегося представления о том, что в H⁺-АТФазах грибов и растений имеется лишь один сайт связывания протонов (ионов гидроксония H₃O⁺), этот фермент подобно Ca²⁺-АТФазе животных обладает двумя такими сайтами (рис. 7), один из которых, очевидно, является дормантным и становится активным лишь в результате мутации [8, 9] или в условиях хронической энергетической недостаточности, также вызванной мутацией [7], а транспортируемым ионом является гидратированный ион гидроксония [8, 9, 25, 27], подобно гидратированным катионам кальция в Ca²⁺- и калия и натрия в Na⁺, K⁺-АТФазах животных клеток. В Na⁺, K⁺-АТФазе петля L5–6 вовлечена в регулирование доступа к сайтам транспорта катионов [33]. Подобное же участие петли L5–6 можно предположить и для Pma1 H⁺-АТФазы, поскольку в двух случаях (Asp-714 и Leu-717) замены остатков в петле приводят к серьезным нарушениям в структурно-функциональной организации фермента, а в случае Pe-719 – к частичному разобщению гидролиза АТФ и транспорта протонов. Представленные данные имеют также определенный практический интерес, поскольку именно в петле L5–6 H⁺, K⁺-АТФазы слизистой желудка животных находится аминокислотный остаток, с которым связываются омепразол

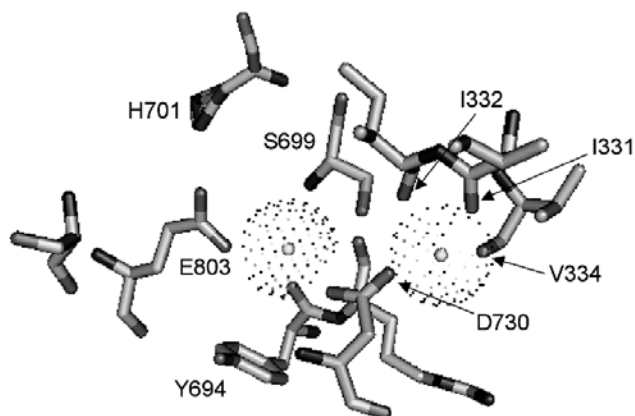


Рис. 7. Сайты связывания и транспорта H⁺. Остатки Pe-331, Pe-332, Val-334 в M4 Pma1 АТФазы соответствуют Val-304, Ala-305 и Pe-307 SERCA Ca²⁺-АТФазы, Ser-699 в M5 соответствует Asn-768, Asp-730 в M6 – Asp-800 и Glu-803 в M8 – Glu-908, участвующих в образовании сайтов I и II SERCA Ca²⁺-АТФазы саркоплазматического ретикулума. Координированные гидратированные ионы H⁺ (H₃O⁺) представлены кружками в сферах. Гомологичная модель построена с использованием кристаллической структуры Ca²⁺-АТФазы, как описано ранее [9, 25]. Приведена модифицированная версия рисунка, опубликованного ранее [25]

и подобные лекарства при язвенной болезни [37], а результаты полученных в данной работе замен аминокислотных остатков на Cys позволят продолжить изучение структурно-функциональной организации Pma1 АТФазы дрожжей и регуляции этого фермента.

Автор выражает благодарность научному консультанту данной работы проф. К.И. Слейман (Yale University School of Medicine, Нью-Хейвен, США), д-ру М. Миранде за конструирование некоторых мутантов, д-ру Х.П. Пардо за помощь в компьютерном моделировании и К.Э. Аллену за помощь в проведении экспериментов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 12-08-01157-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., and Fink, G.R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺,K⁺)K⁺- and Ca²⁺-ATPases, *Nature*, **319**, 689–693.
- Lutsenko, S., and Kaplan, J.H. (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity, *Biochemistry*, **34**, 15607–15613.
- Axelsen, K.B., and Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily, *J. Mol. Evol.*, **46**, 84–101.
- Toyosima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution, *Nature*, **405**, 647–655.
- Toyosima, C., and Nomura, H. (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium, *Nature*, **418**, 605–611.
- Goffeau, A., and Slayman, C.W. (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **639**, 197–223.

7. Warnke, J., and Slayman, C.L. (1980) Metabolic modulation of stoichiometry in a proton pump, *Biochim. Biophys. Acta*, **591**, 224–233.
8. Petrov, V.V., Padmanabha, K.P., Nakamoto, R.K., Allen, K.E., and Slayman, C.W. (2000) Functional role of charged residues in the transmembrane segments of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **275**, 15709–15716.
9. Guerra, G., Petrov, V.V., Allen, K.E., Miranda, M., Pardo, J.P., and Slayman, C.W. (2007) Role of transmembrane segment M8 in the biogenesis and function of yeast plasma-membrane H⁺-ATPase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 2383–2392.
10. Appel, H.J. (2004) Ho do P-type ATPases transport ions, *Bioelectrochemistry*, **63**, 149–156.
11. 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.
12. Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., and Toyosima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution, *Nature*, **459**, 446–450.
13. Auer, M., Scarborough, G.A., and Kuhlbrandt, W. (1998) Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation, *Nature*, **392**, 840–843.
14. Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M., Morth, J.P., Palmgren, M.G., and Nissen, P. (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump, *Nature*, **450**, 1111–1114.
15. Andersen, J.P., and Vilsen, B. (1994) Amino acids Asn796 and Thr799 of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum bind Ca²⁺ at different sites, *J. Biol. Chem.*, **269**, 15931–15936.
16. Rice, W.J., and MacLennan, D.H. (1996) Scanning mutagenesis reveals a similar pattern of mutation sensitivity in transmembrane sequences M4, M5 and M6, but not in M8, of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum (SERCA1a), *J. Biol. Chem.*, **271**, 31412–31419.
17. Zhang, Z., Lewis, D., Strock, C., Inesi, G., Nakasako, M., Nomura, H., and Toyoshima, C. (2000) Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca²⁺ binding and catalytic activation in the Ca²⁺ transport (SERCA) ATPase, *Biochemistry*, **39**, 8758–8767.
18. Vilsen, B., and Andersen, J.P. (1998) Mutation to the glutamate in the fourth membrane segment of Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase affects cation binding from both sides of the membrane and destabilizes the occluded enzyme forms, *Biochemistry*, **37**, 10961–10971.
19. Jewell-Motz, E.A., and Lingrel, J.B. (1993) Site-directed mutagenesis of the Na,K-ATPase: consequences of substitutions of negatively-charged amino acids localized in the transmembrane domains, *Biochemistry*, **32**, 13523–13530.
20. Kuntzweiler, T.A., Arguello, J.M., and Lingrel, J.B. (1996) Asp804 and Asp808 in the transmembrane domain of the Na,K-ATPase a subunit are cation coordinating residues, *J. Biol. Chem.*, **271**, 29682–29687.
21. Nielsen, J.M., Pedersen, P.A., Karlsh, S.J., and Jorgensen, P.L. (1998) Importance of intramembrane carboxylic acids for occlusion of K⁺ ions at equilibrium in renal Na,K-ATPase, *Biochemistry*, **37**, 1961–1968.
22. Ambesi, A., Pan, R.L., and Slayman, C.W. (1996) Alanine-scanning mutagenesis along membrane segment 4 of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. Effects on structure and function, *J. Biol. Chem.*, **271**, 22999–23005.
23. Dutra, M.B., Ambesi, A., and Slayman, C.W. (1998) Structure-function relationships in membrane segment 5 of the yeast Pma1 H⁺-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **273**, 17411–17417.
24. Miranda-Arango, M., Pardo, J.P., and Petrov, V.V. (2009) Role of transmembrane segment M6 in the biogenesis and function of the yeast Pma1 H⁺-ATPase, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **26**, 866–868.
25. Miranda, M., Pardo, J.P., and Petrov, V.V. (2011) Structure-function relationships in membrane segment 6 of the yeast plasma membrane Pma1 H⁺-ATPase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1781–1789.
26. Petrov, V.V. (2009) Heat shock affects functioning of the yeast Pma1 H⁺-ATPase, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **26**, 857–858.
27. Петров В.В. (2010) Точечные мутации в Pma1 H⁺-АТ-Пазе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: влияние на ее экспрессию и активность, *Биохимия*, **75**, 1070–1080.
28. Wei, Y., Chen, J., Rosas, G., Tompkins, D.A., Holt, P.A., and Rao, R. (2000) Phenotypic screening of mutations in Pmr1, the yeast secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, reveals residues critical for ion selectivity and transport, *J. Biol. Chem.*, **275**, 23927–23932.
29. Mandal, D., Woolf, T.B., and Rao, R. (2000) Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue Gln783 in transmembrane segment 6. Residue Asp778 is essential for cation transport, *J. Biol. Chem.*, **275**, 23933–23938.
30. MacLennan, D.H., Rice, W.J., and Green, N.M. (1997) The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases, *J. Biol. Chem.*, **272**, 28815–28818.
31. Morsomme, P., Slayman, C.W., and Goffeau, A. (2000) Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1469**, 133–157.
32. Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., and Karlsh, S.J. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions, *Annu. Rev. Physiol.*, **65**, 817–849.
33. Capendeguy, O., and Horisberger, J.-D. (2005) The role of the third extracellular loop of the Na⁺,K⁺-ATPase alpha subunit in a luminal gating mechanism, *J. Physiol.*, **565**, 207–218.
34. Capendeguy, O., Chodanovski, P., Michielin, O., and Horisberger, J.-D. (2006) Access of extracellular cations to their binding sites in Na,K-ATPase: role of the second extracellular loop of the alpha subunit, *J. Gen. Physiol.*, **127**, 341–352.
35. Capendeguy, O., Iwazkiewicz, J., Michielin, O., and Horisberger, J.-D. (2008) The fourth extracellular loop of the alpha subunit of Na,K-ATPase: functional evidence for close proximity with the second extracellular loop, *J. Biol. Chem.*, **283**, 27850–27858.
36. Munson, K.B., Gutierrez, C., Balaji, V.N., Ramnarayan, K., and Sachs, G. (1991) Identification of an extracytoplasmic region of H⁺,K⁺-ATPase labeled by a K⁺-competitive photoaffinity inhibitor, *J. Biol. Chem.*, **266**, 18976–18988.
37. Besancon, M., Simon, A., Sachs, G., and Shin, J.M. (1997) Sites of reaction of the gastric H,K-ATPase with extracytoplasmic thiol reagents, *J. Biol. Chem.*, **272**, 22438–22446.
38. Seto-Young, D., Na, S., Monk, B.C., Haber, J.E., and Perlin, D.S. (1994) Mutational analysis of the first extracellular loop region of the H⁺-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **269**, 23988–23995.
39. Lutsenko, S., Anderko, R., and Kaplan, J.H. (1995) Membrane disposition of the M5–M6 hairpin of Na⁺,K⁺-ATPase alpha subunit is ligand dependent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7936–7940.
40. Gatto, C., Lutsenko, S., Shin, J.M., Sachs, G., and Kaplan, J.H. (1999) Stabilization of the H,K-ATPase M5M6 membrane hairpin by K⁺ ions. Mechanistic significance for P₂-type ATPases, *J. Biol. Chem.*, **274**, 13737–13740.

41. Mikhailova, L., Mandal, A.K., and Arguello, J.M. (2002) Catalytic phosphorylation of Na,K-ATPase drives the outward movement of its cation-binding H5–H6 hairpin, *Biochemistry*, **41**, 8195–8202.
42. Nakamoto, R.K., Rao, R., and Slayman, C.W. (1991) Expression of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.*, **266**, 7940–7949.
43. Petrov, V.V., and Slayman, C.W. (1995) Site-directed mutagenesis of the yeast PMA1 H⁺-ATPase. Structural and functional role of cysteine residues, *J. Biol. Chem.*, **270**, 28535–28540.
44. Петров В.В. (2009) Функционирование Pma1 H⁺-АТФазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с минимальным набором цистеиновых остатков, *Биохимия*, **74**, 1416–1426.
45. Hager, K.M., Mandala, S.M., Davenport, J.W., Speicher, D.W., Benz, E.J., Jr., and Slayman, C.W. (1986) Amino acid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: deduction from genomic and cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7693–7697.
46. Nakamoto, R.K., Verjovski-Almeida, S., Allen, K.E., Ambesi, A., Rao, R., and Slayman, C.W. (1998) Substitutions of aspartate 378 in the phosphorylation domain of the yeast PMA1 H⁺-ATPase disrupt protein folding and biogenesis, *J. Biol. Chem.*, **273**, 7338–7344.
47. Fabiato, A., and Fabiato, F. (1979) Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells, *J. Physiol. (Paris)*, **75**, 463–505.
48. Fiske, C.H., and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus, *J. Biol. Chem.*, **66**, 375–400.
49. Bensadoun, A., and Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials, *Anal. Biochem.*, **70**, 241–250.
50. Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.*, **157**, 105–132.
51. Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi, *Biochim. Biophys. Acta*, **947**, 1–28.
52. Ambesi, A., Miranda, M., Petrov, V.V., and Slayman, C.W. (2000) Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase, *J. Exp. Biol.*, **203**, 156–160.
53. Ferreira, T., Mason, A.B., Rypaert, M., Allen, K.E., and Slayman, C.W. (2002) Quality control in the yeast secretory pathway: a misfolded PMA1 H⁺-ATPase reveals two checkpoints, *J. Biol. Chem.*, **277**, 21027–21040.
54. Mason, A.B., Allen, K.E., and Slayman, C.W. (2014) C-terminal truncations of the *Saccharomyces cerevisiae* PMA1 H⁺-ATPase have major impacts on protein conformation, trafficking, quality control, and function, *Eukaryot. Cell*, **13**, 43–52.
55. Petrov, V.V., Pardo, J.P., and Slayman, C.W. (1997) Reactive cysteines of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase (PMA1): mapping the sites of inactivation by N-ethylmaleimide, *J. Biol. Chem.*, **277**, 1688–1693.
56. Petrov, V.V. (2012) Cysteine residues of the yeast Pma1 H⁺-ATPase: structural and functional role, in *Cysteine: biosynthesis, chemical structure and toxicity* (Chorkina, F.V., and Karataev, A.I., eds), Nova Science Publishers, Hauppauge, N.Y., pp. 31–60.
57. Supply, P., Wach, A., and Goffeau, A. (1993) Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **268**, 19753–19759.
58. Петров В.В. (1987) Изучение транспорта ионов и метаболитов в везикулы плазматических мембран дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*. Дис. канд. биол. наук, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов, Пушкино.
59. Morrison, K.L., and Weiss, G.A. (2001) Combinatorial alanine-scanning, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 302–307.
60. Mittal, A., Jayaram, B., Shenoy, S., and Bawa, T.S. (2010) A stoichiometry driven universal spatial organization of backbones of folded proteins: are there Chargaff's rules for protein folding, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **28**, 133–142.
61. Mittal, A., and Jayaram, B. (2011) Backbones of folded proteins reveal novel invariant amino acid neighborhoods, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **28**, 443–454.
62. Serrano, R. (1983) *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase, *FEBS Lett.*, **156**, 11–14.
63. Sychrova, H., and Kotyk, A. (1985) Condition of activation of the yeast plasma membrane ATPase, *FEBS Lett.*, **183**, 21–24.
64. Окорочков Л.А., Петров В.В. (1986) Выделение везикул плазматических мембран из дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*, пригодных для транспортных исследований, *Биол. мембраны*, **3**, 549–556.
65. Tomashevsky, A.A., and Petrov, V.V. (2011) Point mutation in M9–M10 loop of the yeast Pma1 H⁺-ATPase affects both ATPase functioning and polyphosphate (PolyP) distribution, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **28**, 1025–1026.
66. Tomashevski, A.A., and Petrov, V.V. (2013) Point mutations in the yeast Pma1 H⁺-ATPase affect polyphosphate (PolyP) distribution, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **31**, suppl. 1, 123–124.

**ROLE OF LOOP L5–6 CONNECTING
TRANSMEMBRANE SEGMENTS M5 AND M6
IN BIOGENESIS AND FUNCTIONING
OF YEAST Pma1 H⁺-ATPase**

V. V. Petrov

*G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology
of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5,
Pushchino 142290, Moscow region, Russia;
E-mail: vpetrov07@gmail.com*

Received May 26, 2014

Revision received July 23, 2014

The L5–6 loop is a short extracytoplasmic stretch (714-DNSLDID) connecting transmembrane segments M5 and M6 forming along with segments M4 and M8 the core through which cations are transported by H⁺-, Ca²⁺-, K⁺, Na⁺-, H⁺, K⁺-, and other P2-ATPases. For studying the structure–function relationships within this loop of the yeast plasma membrane Pma1 H⁺-ATPase, alanine- and cysteine-scanning mutagenesis has been used. Ala and Cys substitutions for the most conserved residue (Leu-717) led to complete blockage of biogenesis. The Ala replacement at Asp-714 caused five-fold decrease of the mutant expression and loss of its activity, while the Cys substitution blocked biogenesis completely. Replacements of other residues did not disturb enzymatic activity. Additional replacements were made for Asp-714 and Asp-720 (Asp→Asn/Glu). Of the substitutions made at Asp-714, only D714N partly restored the mutant enzyme biogenesis and functioning. However, all mutant enzymes with substituted Asp-720 were active. The expressed enzymes (34 to 95% of the wild-type level) showed activity high enough (35–108%) to be analyzed in detail. One of the mutants (I719A) showed three-fold reduced coupling ratio between ATP hydrolysis and H⁺ transport; however, the I719C mutation was rather indistinguishable from the wild-type enzyme. Thus, substitutions at two of seven positions seriously affected biogenesis and/or functioning of the enzyme. Taken together, these results suggest that the M5–M6 loop residues play an important role in protein stability and function, and they probably are responsible for proper arrangement of transmembrane segments M5 and M6 and other domains of the enzyme; it may be also important for regulation of the enzyme.

Key words: yeast, plasma membrane, secretory vesicles, biogenesis, Pma1 H⁺-ATPase, H⁺ transport, site-directed mutagenesis