

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ЭКСТРАЦИТОЗОЛЬНОМ ДОМЕНЕ H^+ -АТФазы ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ЕЕ АКТИВНОСТЬ И РЕГУЛЯЦИЮ

© 2023 г. В. В. Петров*

ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: vpetrov07@gmail.com

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 21.01.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2023 г.

H^+ -АТФаза плазматической мембраны (PMA1), ключевой фермент метаболизма дрожжей, подвергается множественному фосфорилированию во время биогенеза и функционирования. При этом происходит активация АТФазы — феномен, названный глюкозным эффектом. В работе использовали сайт-направленный мутагенез для определения функциональной роли потенциально фосфорилируемых аминокислотных остатков в экстрацитозольной петле L9-10 (846-SENWTD). Мутантные формы фермента были экспрессированы на уровне плазматической мембраны для определения АТФазной активности и влияния мутаций на биогенез фермента. Иммуноблоттинг показал, что экспрессия мутантных форм АТФазы не была существенно нарушена. Базовая активность (в отсутствие глюкозы) мутантных форм фермента незначительно отличалась от таковой дикого типа; в то же время регуляция ферментов E847A, T850A и D851A была нарушена и степень активации глюкозой снижалась в 2–2.5 раза. Мутант S846A, напротив, обладал повышенной базовой активностью и сохранял способность активироваться. Данные указывают на то, что эти остатки (особенно Ser-846, Thr-850 и Asp-851) важны для нормального функционирования PMA1 и ее регулирования глюкозой.

Ключевые слова: глюкозная активация, PMA1 H^+ -АТФаза, плазматическая мембрана, *Saccharomyces cerevisiae*, дрожжи

DOI: 10.31857/S0026365623800017, EDN: FXGVIF

Дрожжи являются не только важным биотехнологическим организмом и объектом медицинских исследований, но и удобной моделью при изучении физиологических процессов в животных и растительных клетках. Одним из жизненно важных ферментов дрожжевой клетки является H^+ -АТФаза плазматической мембраны (PMA1), кодируемая геном *PMA1*, нокаут которого для клетки летален. Будучи протонным насосом, этот фермент создает электрохимический градиент ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), энергия которого используется для активного вторичного транспорта веществ. Большая часть АТФазы находится в цитозольном участке фермента, часть — в мембранном домене и только 3–4% в экстрацитозольном домене, наименее изученном участке АТФазы. Фермент заякорен в мембране за счет 10 трансмембранных сегментов, в которых находятся аминокислотные остатки, образующие сайты транспорта протонов (Ambesi et al., 2000; Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007; Miranda et al., 2011). Сайты связывания АТФ

и фосфорилирования находятся в цитозольной части PMA1 АТФазы: при связывании аденозинтрифосфата происходит *каталитическое* фосфорилирование консервативного остатка Asp (в PMA1 *S. cerevisiae* — Asp-378) с образованием β -аспартилфосфата и последующим гидролизом образующейся макроэргической связи, энергия которой используется на транспорт H^+ из клетки. Функционирование АТФазы и ее регуляция тесно связаны с метаболизмом глюкозы и других ферментируемых сахаров: при добавлении глюкозы к клеткам происходит обратимое быстрое и значительное увеличение активности фермента — феномен, называемый “глюкозным эффектом” (Serrano, 1983). При этом происходит множественное *регуляторное* фосфорилирование молекулы АТФазы. В основном фосфорилируются остатки Ser, в значительно меньших количествах был также обнаружен фосфотреонин (Chang, Slayman, 1991). За 40 лет, прошедшие с момента открытия этого феномена, тонкие механизмы этого эффекта до сих пор полностью не выявлены. Предполагается,

Таблица 1. Олигонуклеотиды, синтезированные для замены аминокислотных остатков Ser-846, Glu-847, Thr-850 и Asp-851 в экстрацитозольной петле L9-10. Триплеты, кодирующие замены, выделены жирным шрифтом и подчеркиванием

Мутация	Последовательность нуклеотидов
S846A	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG <u>GCT</u> GAA AAC TGG < 3'
E847A	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG TCT <u>GCT</u> AAC TGG < 3'
T850A	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG TCT GAA AAC TGG <u>GCT</u> GAT ATT G < 3'
T850S	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG TCT GAA AAC TGG <u>TCT</u> GAT ATT G < 3'
D851A	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG TCT GAA AAC TGG ACT <u>GCT</u> ATT G < 3'

что в процессе созревания фермента и его внутриклеточного трафика фосфорилируются около 10 аминокислотных остатков, из которых установлены только три (Lecchi et al., 2005, 2007; Mazon et al., 2015). Важным доменом этого фермента является С-концевой цитоплазматический участок молекулы, являющийся регуляторным. Показано, что глюкозо-зависимая регуляция активности H^+ -АТФазы дрожжей связана с фосфорилированием tandemно расположенных в этом домене остатков Ser-911 и Thr-912 (Lecchi et al., 2005, 2007); вовлеченность остальных потенциальных фосфосайтов в этот процесс до настоящего времени не установлена. Таким образом, представлялось важным выяснить, влияют ли замены других потенциально фосфорилируемых остатков, расположенных в С-концевой части фермента, на его активность и регуляцию.

Было выбрано несколько таких остатков, находящихся в короткой экстрацитозольной петле L9-10 846-SENWTD, расположенной между трансмембранными сегментами M9 и M10, проведен сайт-направленный мутагенез, и получены мутанты S846A, E847A, T850A, T850S и D851A, у которых изучали вышеуказанные параметры, а также экспрессию.

Следует особо отметить, что данные о роли экстрацитозольной части PMA1 АТФазы очень скудны: изучались только экстрацитозольные петли L1-2 (Seto-Young et al., 1994) и L5-6 (Petrov, 2015; Петров, 2015); в случае петли L9-10 изучалось влияние указанных выше мутаций на накопление различных фракций полифосфатов (Tomashovsky, Petrov, 2022). Влияние мутаций в этих петлях на регуляцию фермента не изучалось.

Представленная работа является частью систематического исследования структурно-функциональной организации PMA1 АТФазы дрожжей. Целью работы являлось изучение влияния точечных замен аминокислотных остатков Ser-846, Glu-847, Thr-850, Asp-851 в экстрацитозольной петле L9-10 С-концевого участка H^+ -АТФазы плазматической мембраны на ее экспрессию, активность и регуляцию глюкозой.

В работе использовали штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* NY13 (MATa ura3-52), ген PMA1 которого контролируется нативным промотором P_{PMA1} (P_{PMA1} -PMA1) и связан с селективным маркером URA3 (Guerra et al., 2007; Петров, 2010), и производные от него мутантные штаммы с различными мутациями в гене PMA1, кодирующими точечные замены аминокислотных остатков. Для этого были синтезированы олигонуклеотиды, несущие замены соответствующих остатков (табл. 1), и с помощью ПЦР проведен сайт-направленный мутагенез (Петров, 2010). Была также получена замена Thr-850 → Ser, которая послужила дополнительным контролем. Культуры дрожжей поддерживали на агаризованной среде, содержащей 2%-ную глюкозу, 6.7 г/л YNB ("Difco", США), 20 мг/л гистидина. Штаммы выращивали на качалке при 30°C на жидкой среде того же состава до середины логарифмической фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием, полученную биомассу промывали дистиллированной водой, делили на две части, которые ресуспендировали в воде, после чего в одну из частей добавляли глюкозу до 2% и инкубировали оба образца с перемешиванием 30 мин при 30°C и осаждали. Затем выделяли плазматические мембраны, которые промывали 1 mM буфером EGTA-Tris, pH 7.5, содержавшим ингибиторы протеаз (2 мкг/мл хеомостатина и лейпептина, 1 мкг/мл

пепстатина и апротинина), и ресуспендировали в том же буфере. Выделенные плазматические мембраны использовали для определения уровня экспрессии и активности. Все препаративные процедуры выполняли при 0–4°C.

Количество экспрессированного белка РМА1 АТФазы определяли с помощью SDS-ПААГ-электрофореза и иммуноблоттинга, как описано ранее (Petrov et al., 2000; Петров, 2010). Блоты обрабатывали поликлональными антителами к РМА1 H^+ -АТФазе, а затем [^{125}I]-белком А (“ICN”, США). Уровень экспрессии мутантной РМА1 АТФазы определяли с помощью прибора PhosphorImager, оснащенный программой ImageQuant (“Molecular Dynamics”, США) и выражали в процентном отношении от количества фермента в штамме дикого типа, выделяемого параллельно в этот же день (Петров, 2010). Измерение активности АТФазы проводили в препаратах плазматических мембран при 30°C в 0.5 мл инкубационной смеси, содержащей 10 мМ $MgSO_4$, 5 мМ Na_2ATP , 50 мМ MES-Tris pH 5.7, 5 мМ KN_3 , 5 мМ фосфоенолпирувата и 50 мкг/мл пируваткиназы в присутствии и в отсутствие 100 мкМ специфического ингибитора Na_3VO_4 . Активность РМА1 рассчитывали по ванадат-чувствительной части ортофосфата, образующегося при гидролизе АТФ. За 100% базовой активности была принята АТФазная активность плазматических мембран, выделяемых из голодающих клеток дикого типа.

РМА1 АТФаза синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме и через аппарат Гольджи и секреторные везикулы достигает плазматической мембраны. На этом секреторном пути находятся пункты контроля качества; если фолдинг фермента был серьезно нарушен, такой белок отбраковывается (Ambesi et al., 2000). Поэтому было важно оценить, влияют ли введенные мутации на экспрессию фермента в плазматических мембранах и, как следствие, на его биогенез. Для этого плазматические мембраны были выделены из голодающих клеток (без глюкозы, рис. 1) и из клеток, метаболизирующих глюкозу (с глюкозой, рис. 1). Количество белка РМА1 дикого типа, полученное из клеток, не инкубированных с глюкозой, было принято за 100%. В обоих случаях мутантная АТФаза с заменой S846A экспрессировалась даже немного лучше, чем фермент дикого типа в родительском штамме NY13, в то время как экспрессия АТФазы в остальных штаммах была понижена: от незначительных 16% (E847A) до заметных 41% (T850S). В штаммах с АТФазой дикого типа и мутациями S846A и D851A сбраживание глюкозы практически не влияло на экспрессию фермента, а в остальных случаях несколько понижало количество мутантной АТФазы в плазматических мембранах (на 10–15%, рис. 1). Следует отметить, что наиболее выраженное влияние мутаций на экс-

прессию наблюдалось в случае гомологичной замены Thr-850 на Ser. Замены этого остатка на Ala приводили к повышению экспрессии на 15–22% по сравнению с T850S, это предполагает, что сериновая замена в большей степени влияет на биогенез и фолдинг фермента, чем замена на аланин. Вместе с тем представленные данные указывают на то, что биогенез мутантных ферментов с заменами в петле L9-10 не был серьезно нарушен, как это было показано, например, в случае замены остатка Leu-717, находящегося в экстрацитозольной петле L5-6, на Ala или Cys. Такие замены приводили к практически полному блокированию внутриклеточного траффика мутантных АТФаз (Petrov, 2015; Петров, 2015).

Для того чтобы оценить, как функционирует фермент, имеющий замены изучаемых остатков, была измерена ферментативная активность препаратов плазматических мембран, выделенных из голодающих клеток (базовая активность), и клеток, метаболизирующих глюкозу (рис. 1). Базовая активность фермента дикого типа была принята за 100%. Базовая активность АТФазы мутантных штаммов наиболее выражено отличалась от таковой дикого типа в случае S846A (увеличение на 45%) и D851A (уменьшение на 30%, рис. 1). В остальных случаях активность менялась незначительно, на 10–13% в ту или иную сторону. На основании этих данных можно предположить, что в штамме S846A АТФаза частично активирована даже в отсутствие глюкозы, в то время как мутация D851A приводила к снижению активности фермента. Присутствие глюкозы приводило к более выраженному влиянию замен на функционирование АТФазы. В штамме с заменой S846A глюкозный эффект был ясно выражен, и уровень активности фермента при сбраживании глюкозы даже превышал отмеченный у родителя; однако, вследствие того, что базовая активность мутанта была выше родительской, степень активации мутантного фермента S846A была несколько ниже, чем у родителя (3.5 и 4.5 раза соответственно, рис. 1). У трех других мутантных ферментов (E847A, T850A и D851A) уровень гидролиза АТФ в активированном состоянии был ниже в 2.3–2.6 раза, чем у дикого типа. У мутанта T850S уровень такой активности и степень активации фермента были значительно выше, чем у мутанта T850A, но на 40% ниже, чем у родительского типа.

Различие в действии замен T850A и T850S косвенно подтверждает, что находящиеся в этой позиции остатки треонина или серина могут фосфорилироваться, но серин может некоторым образом влиять на (локальную) конформацию фермента. Это может указывать на изменения во взаимодействии как различных доменов фермента между собой, так и самой молекулы АТФазы с липидным микроокружением и/или соседними белками. Недавно было показано, что молекулы АТФазы об-

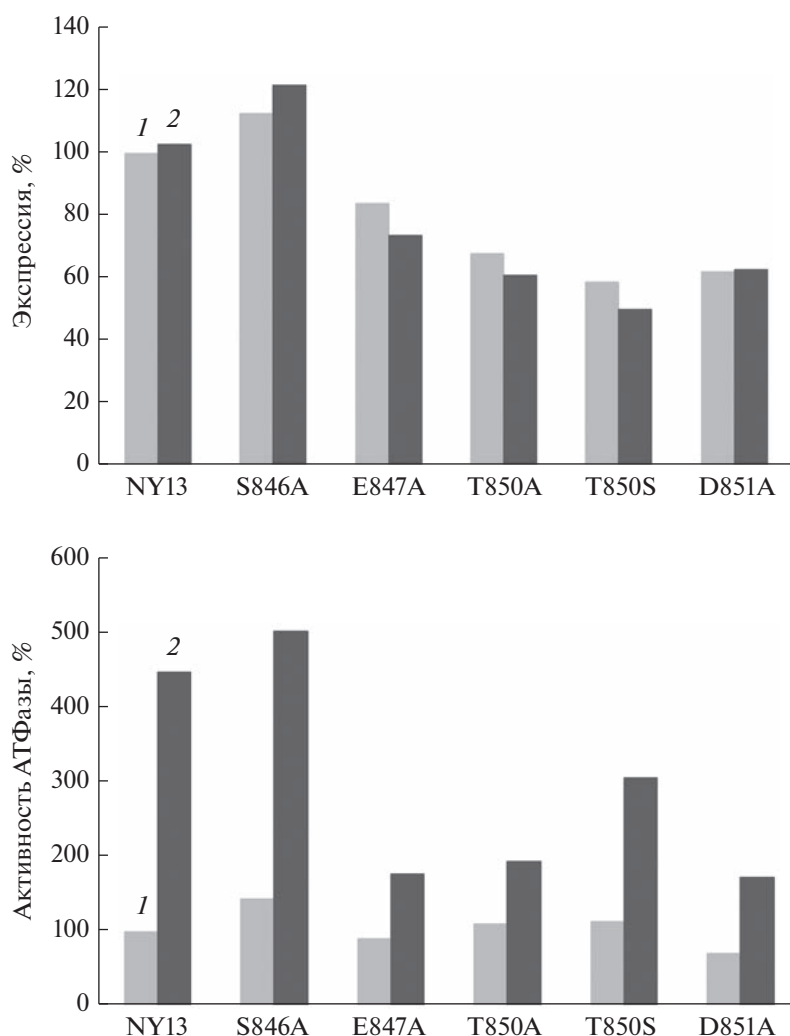


Рис. 1. Влияние мутаций на экспрессию и активность PMA1 H^+ -АТФазы плазматической мембраны *S. cerevisiae* (%). 100% соответствуют экспрессии и активности АТФазы родительского штамма NY13 в отсутствие глюкозы: 1 — без глюкозы; 2 — с глюкозой.

разуют гексамер, где мономеры взаимодействуют друг с другом, в частности, через фосфорилирующий и регуляторный домены (Heit et al., 2021). Нельзя исключить, что во взаимодействии принимают участие и экстрацитозольные части фермента, в том числе потенциально фосфорилируемые остатки, образующие петлю L9-10 — 846-SENWTD. Более того, наше исследование влияния изучаемых замен на метаболизм полифосфатов показало, что все мутации, кроме E847A, заметным образом влияли на распределение полифосфатов по фракциям. Причем наиболее значительными были изменения в штаммах S846A и T850A и носили сходный характер, а характер перераспределения полифосфатов в штамме T850S значительно отличался от такового в указанных штаммах. Распределение полифосфатов в штамме Asp-851 было сходным с наблюдаемым как в случае S846A и T850A, так и в случае T850S (Tomashevsky, Petrov, 2022). Это сви-

детельствовало о том, что остатки Ser-846 и Thr-850 и, вероятно, Asp-851 важны для нормального функционирования PMA1 АТФазы и ее регуляции глюкозой.

Очевидно, для слаженной работы PMA1 АТФазы необходимо наличие нескольких сайтов фосфорилирования (фосфосайтов), из которых главными являются Ser-911 и Thr-912; при удалении этих фосфосайтов или их замене на фосфосайты другого типа (Ser/Thr → Asp) происходят масштабные изменения как в функционировании фермента (Lecchi et al., 2005, 2007; Mazon et al., 2015), так и в энергетическом метаболизме в целом (Tomashevsky, Petrov, 2022). Так, мутации S846A, T850A и D851A вызывали значительное перераспределение коротко- и среднецепочечных фракций полифосфатов (и в целом увеличение суммарного количества полифосфатов), в то время как эффект T850S был менее выражен, а в

случае E847A практически отсутствовал. Данные, представленные в настоящей работе, предполагают, что в общем процессе регуляции участвуют дополнительные сайты фосфорилирования, в том числе и изучаемые здесь Ser-846, Thr-850 и Asp-851. При удалении этих фосфосайтов происходит разсогласованность функционирования PMA1 АТФазы и нарушение ее регуляции глюкозой. Дальнейшие исследования помогут пролить свет на тонкие механизмы регуляции этого жизненно важного фермента метаболизма дрожжей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Петров В.В. Точечные мутации в Pma1 H⁺-АТФазе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: влияние на ее экспрессию и активность // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 1170–1180.
- Petrov V.V. Point mutations in Pma1 H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: influence on its expression and activity // Biochemistry (Moscow). 2010. V. 75. P. 1055–1063.
- Петров В.В. Роль петли L5-6, соединяющей мембранные сегменты M5 и M6, в биогенезе и функционировании Pma1 H⁺-АТФазы дрожжей // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 41–58.
- Petrov V.V. Role of loop L5-6 connecting transmembrane segments M5 and M6 in biogenesis and functioning of yeast Pma1 H⁺-ATPase // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 31–44.
- Ambesi A., Miranda M., Petrov V.V., Slayman C.W. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase // J. Exp. Biol. 2000. V. 203. P. 156–160.
- Chang A., Slayman C.W. Maturation of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase involves phosphorylation during intracellular transport // J. Cell. Biol. 1991. V. 115. P. 289–295.
- Guerra G., Petrov V.V., Allen K.E., Miranda M., Pardo J.P., Slayman C.W. Role of transmembrane segment M8 in the biogenesis and function of yeast plasma-membrane H⁺-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. P. 2383–2392.
- Heit S., Geurts M.M.G., Murphy B.J., Corey R.A., Mills D.J., Kühlbrandt W., Bublit M. Structure of the hexameric fungal plasma membrane proton pump in its autoinhibited state // Sci. Adv. 2021. V. 7. Art. eabj5255. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj5255>
- Lecchi S., Allen K.E., Pardo J.P., Mason A.B., Slayman C.W. Conformational changes of yeast plasma membrane H⁺-ATPase during activation by glucose: role of threonine-912 in the carboxy-terminal tail // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 16624–16632.
- Lecchi S., Nelson C.J., Allen K.E., Swaney D.L., Thompson K.L., Coon J.J., Sussman M.R., Slayman C.W. Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase leads to glucose-dependent activation // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 35471–35481.
- Mazon M.J., Eraso P., Portillo F. Specific phosphoantibodies reveal two phosphorylation sites in yeast Pma1 in response to glucose // FEMS Yeast Res. 2015. V. 15. P. 1–9.
- Miranda M., Pardo J.P., Petrov V.V. Structure-function relationships in membrane segment 6 of the yeast plasma membrane Pma1 H⁺-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1808. P. 1781–1789.
- Petrov V.V. Point mutations in the extracytosolic loop between transmembrane segments M5 and M6 of the yeast Pma1 H⁺-ATPase: alanine-scanning mutagenesis // J. Biomol. Struct. Dynam. 2015. V. 33. P. 70–84.
- Petrov V.V., Padmanabha K.P., Nakamoto R.K., Allen K.E., Slayman C.W. Functional role of charged residues in the transmembrane segments of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 15709–15716.
- Serrano R. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase // FEBS Lett. 1983. V. 156. P. 11–14.
- Seto-Young D., Na S., Monk B.C., Haber J.F., Perlin D.S. Mutational analysis of the first extracellular loop region of the H⁺-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 23988–23995.
- Tomashevsky A.A., Petrov V.V. Point mutations in the different domains of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane PMA1 ATPase cause redistribution among fractions of inorganic polyphosphates // J. Biomol. Struct. Dyn. 2022. V. 40. P. 635–647. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1815582>

Effect of Mutations in the Extracytosolic Domain of the *Saccharomyces cerevisiae* H⁺-ATPase on Its Activity and Regulation

V. V. Petrov*

Pushchino Research Center for Biological Research, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: vpetrov07@gmail.com

Received November 30, 2022; revised January 21, 2023; accepted January 23, 2023

Abstract—Plasma membrane H⁺-ATPase (PMA1), the key enzyme of yeast metabolism, undergoes multiple phosphorylation during biogenesis and functioning. In the course of this process, the ATPase is getting activated (glucose effect). We have employed site-directed mutagenesis to determine the functional role of po-

tentially phosphorylable amino acid residues located in the extracytosolic L9-10 loop (846-SENWTD). The mutant enzyme forms were expressed at the plasma membrane to examine the effect of substitutions on biogenesis and ATPase activity. Immunoblotting revealed that the mutant ATPase expression was not significantly impaired. In the absence of glucose, basal activity of the mutant enzymes differed insignificantly from that of the wild type. At the same time, regulation of the mutant E847A, T850A, and D851A enzymes has been impaired; the level of enzyme activation by glucose was lower by 2.0–2.5-fold. On the contrary, the S846A mutant displayed elevated basal activity, maintaining the ability to undergo further activation. These data indicate that these residues (especially, Ser-846, Thr-850, and Asp-851) are essential for the normal functioning of the PMA1 and its regulation by glucose.

Keywords: glucose activation, PMA1 H⁺-ATPase, plasma membrane, *Saccharomyces cerevisiae*, yeasts