
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.151.63

ЗНАЧЕНИЕ МЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ М6 И М8 В БИОГЕНЕЗЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ РМА1 Н⁺-АТФАЗЫ ДРОЖЖЕЙ

© 2025 г. В. В. Петров

Федеральный исследовательский центр “Пущинский научный центр биологических исследований РАН”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрябина,
142290, Пущино, Московская обл., Россия
e-mail: vpetrov07@gmail.com

Поступила в редакцию 03.10.2024 г.

После доработки 26.10.2024 г.

Принята к публикации 19.11.2024 г.

Мембранный домен РМА1 Н⁺-АТФазы плазматической мембраны дрожжей образуют 10 трансмембранных сегментов (М1–М10), из которых сегменты М6 и М8 являются особенно важными. Для их изучения использовали аланин-сканирующий мутагенез, заменяя каждый из остатков, образующих сегменты, на аланин. Ферменты экспрессировали с плазмидного гена *rma1* в секреторных везикулах в условиях теплового шока. В М6 в половине случаев мутантные белки теряли активность (0–7%), но были экспрессированы на уровне 15–87% от дикого типа. В М8 у трети мутантов наблюдался блок в биогенезе (0–7%) или значительное снижение экспрессии (до 16–17%), сопровождавшееся почти полной потерей ферментативной активности (0–10%). Поскольку экспрессирование в секреторных везикулах требует использования повышенной температуры, было проверено действие мутаций, вызывающих нарушение экспрессии и АТФазной активности, на биогенез и функционирование фермента в отсутствие теплового шока, для чего экспрессию осуществляли в плазматических мембранах с хромосомного гена *PMA1* при пермиссивной температуре. В случае М6 лишь один мутант из десяти неактивных (F728A) был экспрессирован в плазматической мемbrane и обладал активностью на уровне дикого типа; остальные мутанты были нежизнеспособными. В случае М8 только мутанты Q798A и I799A не были способны экспрессироваться на уровне плазмалеммы, в то время как I794A, F796A, L797A, L801A экспрессировались на 35–89% и обладали активностью 14–65% от уровня дикого типа. Было сравнено влияние мутаций F728A и F796A на структурно-функциональную организацию РМА1 АТФазы и ее регуляцию при глюкозо-зависимой активации фермента. Обе мутации снижали активность АТФазы на 30–50% и степень ее активации на 30–40%. Даные позволяют сделать вывод о том, что замены в сегменте М6 влияют в первую очередь на функционирование фермента и в меньшей степени на его конформацию и биогенез, предполагая участие исследуемых аминокислотных остатков в транспортном процессе. Остатки в М8, наоборот, играют большую роль в биогенезе АТФазы. В целом, результаты подтверждают важную роль аминокислотных остатков в М6 и М8 для структурно-функциональной организации РМА1 Н⁺-АТФазы и указывают на то, что М6 содержит больше остатков, влияющих на функционирование фермента.

Ключевые слова: дрожжи, плазматическая мембрана, секреторные везикулы, РМА1 Н⁺-АТФаза, мембранные сегменты, сайт-направленный мутагенез, тепловой шок

DOI: 10.31857/S0026365625020051

Структурно-функциональная организация ферментов активно изучается в последнее время. К таким изучаемым ферментам относится Н⁺-АТФаза плазматической мембраны грибов и дрожжей (РМА1), входящая в широко распространенное и физиологически важное семейство Р2-АТФаз (Lutsenko, Kaplan, 1995), к которому также относятся Н⁺-АТФаза плазматической мембраны растений и Н⁺,K⁺-, Na⁺,K⁺-, Cu²⁺-, Ca²⁺- и другие АТФазы животных. Будучи одновременно фосфогидролазами и ионными насосами, эти ферменты

сопрягают энергию гидролиза АТФ с транспортом различных моно- и дивалентных катионов (от Н⁺, K⁺, Na⁺, Cu⁺ до Cu²⁺, Zn²⁺ и Mn²⁺) через клеточные мембранны (Lutsenko, Kaplan, 1995; Axelsen, Palmgren, 1998). РМА1 Н⁺-АТФаза является жизненно необходимым ферментом, создающим на плазматической мембране электрохимический градиент протонов, $\Delta\mu_{H^+}$, энергия которого обеспечивает работу вторичных транспортных систем, регулирует ионный гомеостаз и поддерживает внутриклеточный pH.

P2-АТФазы имеют одну главную каталитическую субъединицу, заложенную в липидном бислойе 10 трансмембранными гидрофобными α -спиралями разной длины и наклона (M1–M10). Эти сегменты образуют мембранный домен фермента, в четырех из них (M4, M5, M6, M8) находятся аминокислотные остатки, участвующие в формировании сайтов связывания и транспорта катионов. P2-АТФазы обладают общим каталитическим механизмом, при котором фермент связывает АТФ с образованием макроэргического β -аспартилфосфатного интермедиата, энергия которого расходуется на транспорт катионов через мембрану. Ионные насосы Р-типа отличаются как ионной специфичностью, так и стехиометрией транспорта, данные о которых были получены при проведении мутагенеза этих АТФаз (Jewell-Motz, Lingrel, 1993; Kuntzweiler et al., 1996; Rice, MacLennan, 1996; Nilsen et al., 1998; Petrov et al., 2000; Mandal et al., 2000; Ambesi et al., 2000; Buch-Pedersen et al., 2000; Hermansen et al., 2000; Morsomme et al., 2000; Wei et al., 2000; Zhang et al., 2000; Asano et al., 2001; Buch-Pedersen, Palmgren, 2003; Guerra et al., 2007; Miranda et al., 2011; Petrov, 2015; Петров, 2010, 2015) и их рентгеноструктурном анализе (Toyoshima, Nomura, 2002; Morth et al., 2007; Pedersen et al., 2007; Ogava et al., 2009; Shinoda et al., 2009; Toyoshima et al., 2000, 2007, 2013; Nyblom et al., 2013; Kanai et al., 2013). Они указывают, что детерминанты катионной специфичности и стехиометрии транспорта находятся в трансмембранных сегментах M4, M5, M6 и M8 этих ферментов. Особо интересными представляются сегменты M6 и M8, первый из которых отвечает за специфичность ионного транспорта (Mandal et al., 2000; Buch-Pedersen et al., 2003; Miranda et al., 2011), а второй – за его стехиометрию (Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007).

Во время реакционного цикла P2-АТФазы претерпевают существенные конформационные изменения, при которых *N*-концевые (M1–M4) и часть *C*-концевых (M5 и M6) мембранных сегментов сгибаются, меняют угол наклона, частично разворачиваются, выходят из мембраны, расположаясь параллельно поверхности, в то время как *C*-концевые сегменты M7–M10 менее подвижны (Toyoshima, Nomura, 2002; Toyoshima et al., 2007). В сегменте M6 PMA1 АТФазы *Saccharomyces cerevisiae* одним из наиболее важных остатков является Asp-730, определяющий одну из детерминант транспорта, отвечающую за катионную специфичность и участвуя в формировании двух сайтов связывания и транслокации катионов (Petrov et al., 2000; Miranda et al., 2011). В сегменте M8 наиболее важным является остаток Glu-803, отвечающий за стехиометрию транспорта (Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007). Роль этих остатков и некоторых других, замены которых обладали активностью, была изучена ранее.

Вместе с тем замена половины остатков, составляющих M6, и около трети остатков, составляющих M8, приводила к потере АТФазной активности и/или к блоку в биогенезе, мешающему полноценной экспрессии мутантных ферментов в секреторных везикулах. Поскольку экспрессия PMA1 АТФазы в секреторных везикулах находилась под контролем индуцируемого тепловым шоком промотора *HSE*, представлялось логичным осуществить экспрессию мутантных белков в плазматических мембранах в отсутствие теплового шока, чтобы выяснить роль остатков, замены которых приводят к появлению неактивных ферментов, в структурно-функциональной организации PMA1 АТФазы.

Представленные результаты являются дальнейшим продолжением систематического изучения структурно-функциональной организации PMA1 H^+ -АТФазы плазматической мембраны дрожжей в трансмембранных сегментах M6 и M8 и сфокусированы на фенилаланильных остатках Phe-728 (M6) и Phe-796 (M8) с целью выяснения их роли в поддержании структуры и функционирования фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы дрожжей. В работе использовали штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* SY4 (*MATa; ura3-52; leu2-3, 112; his4-619; sec6-4; GAL; pma1::YIpGAL-PMA1*) и NY13 (*MATa ura3-52*). В штамме SY4 присутствовали хромосомная (*PMA1*) и плазмидная (*pma1*) копии гена, кодирующего PMA1 H^+ -АТФазу, находившиеся под контролем разных промоторов: хромосомная копия гена АТФазы дикого типа – под контролем промотора *GAL1* (*P_{GAL}-PMA1*), плазмидная (на центромерной плазмиде YCp2HSE) – под контролем индуцируемого тепловым шоком промотора *HSE* (*P_{HSE}-pma1*) (Nakamoto et al., 1991). При этом сам плазмидный ген *pma1* был или родительского типа или мутантный. Штамм SY4 также содержал температурно-чувствительную мутацию в *SEC6* гене, блокирующую слияние секреторных везикул с плазматической мембраной при тепловом шоке и приводящую к накоплению секреторных везикул. В штамме NY13 ген *PMA1* находился под контролем нативного промотора *P_{PMA1}* (*P_{PMA1}-PMA1*) и был связан с селективным маркером *URA3* (Guerra et al., 2007; Петров, 2010). Производные от него штаммы несли мутации в гене *PMA1*, кодирующие точечные замены аминокислотных остатков в трансмембранных сегментах M6 и M8.

Сайт-направленный мутагенез и конструирование мутантов. Для введения мутаций в ген *pma1* использовали фрагмент *Bgl*II-*Sal*II (519 п.н.)

этого гена, предварительно субклонированный в модифицированную версию плазмида Bluescript (“Stratagene”, США), синтезировали мутантные олигонуклеотиды, кодирующие замены изучаемых остатков на Ala, и использовали их для введения мутаций с помощью ПЦР. По завершении мутагенеза фрагменты секвенировали для подтверждения наличия мутаций и отсутствия нежелательных замен других оснований. Затем этими фрагментами с помощью рестрикционных эндонуклеаз BglIII, HindIII, SacI, SalI и T4 ДНК-лигазы (“New England Biolabs”, США) последовательно замещали соответствующие участки в плазмиде pPMA1.2, несущей полную кодирующую последовательность гена *rma1* (Nakamoto et al., 1991). Для получения экспрессии РМА1 H⁺-АТФазы в секреторных везикулах фрагмент *HindIII-SacI* (3.77 т.п.н.), содержащий полную кодирующую последовательность гена, с помощью рестрикционных эндонуклеаз HindIII и SacI и T4 ДНК-лигазы переносили под контроль промотора *HSE* (*P_{HSE}-rma1*) в центромерную плазмиду YCp2HSE, которой трансформировали штамм *S. cerevisiae* SY4 (Nakamoto et al., 1991).

Для получения экспрессии РМА1 H⁺-АТФазы в плазматических мембранах участок ДНК, содержащий мутацию, вносили в плазмиду pVP3, из которой затем вырезали участок *HindIII-HindIII* (6.1 т.п.н.), содержащий полную последовательность гена *PMA1* и маркер *URA3*, и этим линейным фрагментом трансформировали штамм *S. cerevisiae* NY13, после чего трансформанты высевали на селективную среду и отбирали выросшие колонии. Из полученных штаммов с помощью набора QIAGEN (США) экстрагировали плазмидную (YCp2HSE-PMA1) или хромосомную ДНК и вновь секвенировали для подтверждения наличия мутаций.

Выделение секреторных везикул. Для получения секреторных везикул клетки штамма *S. cerevisiae* SY4 выращивали при 23°C на качалке до середины логарифмической фазы роста ($A_{600} \sim 0.7-1.0$) в 800 мл среды, содержащей 6.7 г/л YNB (Yeast Nitrogen Base, “Difco”, США), 20 мг/л гистидина и 2%-ную галактозу, а затем отмывали от среды с галактозой и переносили в 400 мл среды, содержащей 2%-ную глюкозу. Через 3 ч инкубации с глюкозой дрожжи подвергали тепловому шоку, повышая температуру до 39°C, и инкубировали еще 2 ч. За 10 мин до окончания теплового шока к суспензии клеток добавляли 4 мл 1 М NaN₃, который блокировал метаболизм, предотвращая слияние везикул с плазматической мембраной (Nakamoto et al., 1991), и 10 мин охлаждали в воде со льдом. Клетки осаждали центрифугированием, промывали 10 mM NaN₃ и ресуспензировали в буфере, содержащем 1.4 M сорбит, 10 mM NaN₃, 50 mM K₂PO₄-NaOH; pH 7.5. Затем добавляли зимолиазу 20T (“ICN”, США) и инкубировали 30–40 мин при

39°C для получения сферопластов, которые после промывки и ресуспензирования в том же буфере обрабатывали конканавалином А (“Sigma”, США) для утяжеления плазматических мембран. Сфероплазмы механически разрушали в гипотонической среде (1 mM ЭДТА, 10 mM триэтаноламин-уксусная кислота, pH 7.2, 1 mM дизопропилфторфосфат, 2 мкг/мл химостатина и по 1 мкг/мл лейпептина, пепстата и апратинина), содержавшей 12.5%-ную сахарозу (Nakamoto et al., 1991; Petrov, Slayman, 1995; Petrov et al., 2000). После получения сферопластов все последующие процедуры проводили при 0–4°C. Гомогенат центрифугировали при низких скоростях, осадок отбрасывали, а из надосадочной жидкости с помощью дифференциального центрифugирования и очистки центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007) выделяли секреторные везикулы, содержащие вновь синтезированную АТФазу, и супензировали в буфере, содержавшем 0.8 M сорбит, 1 mM ЭДТА, 10 mM триэтаноламин-уксусную кислоту, pH 7.2, и указанные выше ингибиторы протеаз, кроме дизопропилфторфосфата, как описано ранее (Petrov, Slayman, 1995; Petrov et al., 2000).

Выделение плазматических мембран. Штаммы дрожжей *S. cerevisiae* NY13 выращивали на качалке при 30°C на жидкой среде, содержащей 2%-ную глюкозу, 6.7 г/л YNB (“Difco”, США), 20 мг/л гистидина, до середины логарифмической фазы роста. При изучении влияния мутаций на биогенез и активность АТРазы клетки осаждали центрифугированием, промывали водой и инкубировали с 2%-ной глюкозой. При изучении процессов, связанных с глюкозо-зависимой активацией, клетки после промывки водой ресуспензировали и делили на две части, к одной из которых добавляли глюкозу до конечной концентрации 2% и инкубировали при 30°C в течение 30 мин. Затем, в обоих случаях, клетки вновь осаждали и разрушали на аппарате French Press Cell (“SLM-Aminco”, Urbana, США) и выделяли плазматические мембранные с использованием дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Препарат, обогащенный плазматическими мембранными, промывали 1 mM-ым буфером EGTA-Tris, pH 7.5, содержащим ингибиторы протеаз (2 мкг/мл химостатина и лейпептина, 1 мкг/мл пепстата и апратинина) и ресуспензировали в том же буфере. Выделенные плазматические мембранные использовали для определения уровня экспрессии и активности. Все препаративные процедуры выполняли при 0–4°C.

Количество экспрессированного белка РМА1 АТФазы в секреторных везикулах и плазматических мембранных определяли с помощью SDS-ПААГ-электрофореза и иммуноблоттинга, как описано ранее (Nakamoto et al., 1991; Petrov, Slayman, 1995;

Petrov et al., 2000). Блоты обрабатывали поликлональными антителами к гомологичной РМА1 Н⁺-АТФазе *Neurospora crassa*, а затем [¹²⁵I]-белком А (“ICN”, США). Уровень экспрессии АТФазы дикого типа и мутантных определяли с помощью прибора PhosphorImager, оснащенного программой ImageQuant (“Molecular Dynamics”, США), и выражали в процентном отношении от количества фермента в штамме дикого типа, выделяемого параллельно в этот же день (Petrov, Slayman, 1995). Под уровнем экспрессии понимали количество экспрессированного белка в секреторных везикулах или плазматических мембранах.

Гидролиз АТФ проводили в течение 10–30 мин при 30°C в 0.5 мл инкубационной смеси, содержащей 10 мМ MgSO₄, 5 мМ Na₂АТФ, 50 мМ MES-Трис, pH 5.70, 5 мМ KN₃ и АТФ-регенерирующую систему (5 мМ фосфоенолпирват и 50 мкг/мл пируваткиназы, “Sigma-Aldrich”, США) в присутствии и в отсутствие 100 мКМ ортованадата натрия (Petrov, Slayman, 1995; Petrov et al., 2000). Неорганический ортофосфат определяли согласно методу Фиске–Суббароу (Fiske, Subbarow, 1925).

Определение белка. Белок определяли модифицированным методом Лоури (Bensadoun, Weinstein, 1976), используя БСА как стандарт; к стандарту добавляли аликвоты буфера, в котором ресуспендировали секреторные везикулы или плазматические мембранны.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мутантные ферменты в секреторных везикулах. Ранее для изучения структурно-функциональной организации РМА1 Н⁺-АТФазы нами был использован сайт-направленный аланинсканирующий мутагенез аминокислотных остатков в трансмембранных сегментах М6 (Miranda et al., 2011) и М8 (Guerra et al., 2007). С помощью мутагенеза были получены точечные замены аминокислотных остатков, образующих сегменты М6 (721-LIVFIAIFADVATLAIAYD; рис. 1) и М8 (791-MNGIMFLQISLTENWLIFITR; рис. 2) РМА1 Н⁺-АТФазы дрожжей *S. cerevisiae*. Фрагменты *Bg*II-*Sa*II гена *rma1*, несущие мутации, были клонированы в содержащую полную кодирующую последовательность гена *rma1* плазмиду pРМА1.2 (Nakamoto et al., 1991), после чего ген был встроен под контроль индуцируемого тепловым шоком промотора *HSE* в центромерную плазмиду YCp2HSE, которой затем трансформировали клетки *S. cerevisiae* штамма SY4, где хромосомная копия гена РМА1 находилась под контролем промотора *GAL1* (Nakamoto et al., 1991).

Дрожжи выращивали при 23°C на среде с галактозой до середины логарифмической фазы роста; при этом с хромосомного гена РМА1

синтезировался фермент дикого типа. Затем клетки переносили на среду с глюкозой; при этом синтез с гена РМА1 дикого типа останавливался (секреторный путь очищался от фермента дикого типа), а при повышении температуры до 39°C начинался с плазмидного гена *rma1*, кодирующего дикий или мутантный тип АТФазы. В штамме SY4 также имелась температурно-чувствительная мутация *sec6-4*, блокирующая слияние секреторных везикул с плазматической мембраной, поэтому повышение температуры до 39°C приводило к накоплению секреторных везикул, содержащих фермент, синтезированный *de novo* с плазмидного гена *rma1* (Nakamoto et al., 1991). Секреторные везикулы, практически свободные от примеси плазматических мембран (2–3%), выделяли с помощью дифференциального центрифугирования, очищали центрифугированием в градиенте плотности сахараозы и определяли уровень экспрессии фермента и его активность.

Используемый нами метод выделения секреторных везикул позволяет получать препарат, содержащий мутантные формы фермента, потерявшие активность. Было выявлено, что замена половины остатков (10 из 19) в М6 (Miranda et al., 2011) не затрагивала существенно экспрессию (26–87% от уровня дикого типа), но вызывала серьезные нарушения функционирования фермента (L721A, I722A, F724A, I727A, F728A, L734A, Y738A), приводящие к потере АТФ-гидролазной и Н⁺-транслоказной активности, а в случаях I725A, D730A, D739A серьезно нарушался и биогенез, причем в двух последних случаях наблюдался полный блок в биогенезе (табл. 1). Остальные замены в М6 были экспрессированы на достаточном уровне с сохранением активности для детального исследования и были изучены ранее (Miranda et al., 2011).

В сегменте М8 остатков, замена которых приводила к потере активности и/или нарушению биогенеза значительно меньше (6 из 21), при этом главную роль играло нарушение биогенеза фермента: блок биогенеза наблюдался в случаях I794A, F796A, Q798A и I799A, еще в двух случаях (L801A и I807A) экспрессия уменьшалась в 6 раз (табл. 2). В случае L801A и I807A экспрессия была на уровне, который мог бы быть достаточным для более детальных исследований, но их активность была слишком низка для этого. Замена еще одного остатка (L797A) приводила к шестикратному снижению экспрессии и пятикратному – активности, что, однако, позволяло использовать этот мутант для более детального исследования как дополнительный контроль. Остальные мутантные ферменты в М8 были экспрессированы на достаточном уровне с сохранением активности для детального исследования (Guerra et al., 2007).

Что касается остатков, мутации которых приводили к отрицательным последствиям, действие

Таблица 1. Консервативность и влияние аланиновых замен аминокислотных остатков в мембранном сегменте M6 на биогенез PMA1 АТФазы и ее активность в секреторных везикулах и плазматических мембранах (%)¹

Штамм	Консервативность ²	Секреторные везикулы ³		Плазматические мембранны ⁴	
		Экспрессия	Гидролиз АТФ	Экспрессия	Гидролиз АТФ
Дикий	100	100	100	100	100
L721A	100	32	4	—	—
I722A	56	26	5	—	—
F724A	100	73	6	—	—
I725A	98	15	1	—	—
I727A	88	26	1	—	—
F728A	100	43	5	107	81
D730A	100	0	0	—	—
L734A	88	75	2	—	—
Y738A	100	87	7	—	—
D739A	100	3	0	—	—

Примечание. ¹Специфическую экспрессию 100-кДа субъединицы АТФазы определяли количественным иммуноблоттингом, как описано в методической части; представлена как процент от экспрессии фермента дикого штамма, выделяемого параллельно в тот же день. ²В аскомицетах и PMA1 базидиомицета *U. maydis*. ³АТФазную активность в секреторных везикулах, выделенных из штамма SY4, измеряли при pH 5.70; 100% соответствовало 4.44 мкмоль P_i /мин на 1 мг белка. Представлены средние данные из 2–8 опытов. ⁴АТФазную активность в плазматических мембранах, выделенных из штамма NY13, измеряли при pH 6.25; 100% соответствовало 6.95 мкмоль P_i /мин на 1 мг белка. Представлены средние данные из 2–4 опытов.

Таблица 2. Консервативность и влияние аланиновых замен аминокислотных остатков в мембранном сегменте M8 на биогенез PMA1 АТФазы и ее активность в секреторных везикулах и плазматических мембранах (%)¹

Штамм	Консервативность ²	Секреторные везикулы ³		Плазматические мембранны ⁴	
		Экспрессия	Гидролиз АТФ	Экспрессия	Гидролиз АТФ
Дикий	100	100	100	100	100
I794A	44	6	3	35	14
F796A	100	7	3	72	24
L797A	96	17	19	79	36
Q798A	98	0	0	—	—
I799A	98	3	1	—	—
L801A	98	17	6	88	65
I807A	100	16	10	*	*

Примечание. ¹Специфическую экспрессию 100-кДа субъединицы АТРазы определяли количественным иммуноблоттингом, как описано в методической части; представлена как процент от экспрессии фермента дикого штамма (SY4 или NY13), выделяемого параллельно в тот же день. ²В аскомицетах и PMA1 базидиомицета *U. maydis*. ³АТФазную активность в секреторных везикулах, выделенных из штамма SY4, измеряли при pH 5.70; 100% соответствовало 5.50 мкмоль P_i /мин на 1 мг белка. Представлены средние данные из 2–10 опытов мутантов. ⁴АТФазную активность в плазматических мембранах, выделенных из штамма NY13, измеряли при pH 6.25; 100% соответствовало 7.22 мкмоль P_i /мин на 1 мг белка. Представлены средние данные из 2–4 опытов. *Опыты не проводились.

замен в сегментах M6 и M8 разительно отличалось: в M6 мутанты, несущие неактивный фермент (L721A, I722A, F724A, I727A, F728A, L734A, Y738A) были экспрессированы на 26–87% от уровня дикого типа; в одном случае экспрессия была сильно снижена и составляла 15%, а активность отсутствовала (I725A, табл. 1). Биогенез фермента с заменами функционально важных Asp-730 и Asp-739 (D730A и D739A) был полностью блокирован

только в этих двух случаях. Для M8 картина была отличной: биогенез “неактивных” мутантных ферментов был блокирован, составляя от 0% (Q798A) до 3–7% (I794A, F796A, I799A) уровня дикого типа. Поэтому трудно было определить, что являлось первичной причиной нарушений: блок в биогенезе или падение активности – или же обе причины одновременно. Только в двух случаях экспрессия составляла 16–17% при активности 6–10% (L801A

и I807A, табл. 2), что было недостаточно для их дальнейшего исследования. Еще в одном случае (L797A) мутантный фермент экспрессировался на этом же уровне (17%) и обладал незначительной активностью (19%), достаточной, однако, для более детального изучения активности АТФазы.

Консервативность изучаемых аминокислотных остатков. Представлялось существенным проанализировать степень консервативности остатков. При изучении роли того или иного остатка можно ожидать, что его консервативность будет иметь большое значение, однако это не является абсолютным правилом (Петров, 2010, 2015; Petrov, 2015). Поэтому было желательно выяснить консервативность аминокислотных остатков в М6 и М8, замены которых приводили к отрицательным последствиям. Для сравнения аминокислотных последовательностей различных Н⁺-АТФаз плазматических мембран был использован алгоритм Clustal X (Thompson et al., 1994) с последующей визуальной инспекцией и корректировкой. Степень консервативности остатков, составляющих М6 (рис. 1) и М8 (рис. 2), различается. В М6 консервативность (идентичность) изучаемых остатков АТФаз аскомицетов (от *Saccharomyces cerevisiae* до *Leptosphaeria maculans*, рис. 1), а также РМА1 АТФазы базидиомицета *Ustilago maydis*, имеющего две формы АТФазы (рис. 1), одна из которых гомологична дрожжевой РМА1, а другая – растительной АНА2 (Robles-Martinez et al., 2013), составляет 56–100% (рис. 1): остатки Leu-721, Phe-724, Phe-728, Asp-730, Тгу-738, Asp-739 на 100% консервативны, в то время как Іле-722 консервативен на 56% (на 27 остатков Іле приходится 21 остаток Val), Іле-725 – на 98% (47 Іле, 1 Leu), Іле-727 – на 88% (42 Іле, 6 Leu), Leu-734 – на 88% (42 Leu, 5 Іле, 1 Val). Среди остальных базидиомицетов, водорослей и растений 100%-я консервативность сохраняется только у трех остатков – Ala-726 (не являющегося объектом данного исследования), Asp-730 и Asp-739 (рис. 1). Гомологичность всех изучаемых аминокислотных остатков в М6 была 100%-ной для аскомицетов и РМА1 АТФазы *U. maydis*. В то же время для остальных базидиомицетов, водорослей и растений гомологичность изучаемых остатков была низка (за исключением Asp-730 и Asp-739; рис. 1). В АТФазах животных только аспартильный остаток, соответствующий Asp-730 РМА1 АТФазы *S. cerevisiae*, строго консервативен (рис. 3). Биогенез большинства из этих мутантных ферментов не был блокирован (за исключением Asp-730 и Asp-739), но сами ферменты теряли активность (табл. 1). Следует отметить, что консервативность остатков не влияла заметным образом на экспрессию изучаемых мутантных ферментов. Так экспрессия мутантного фермента I722A составляла 26% от уровня дикого типа при 56%-ной консервативности в аскомицетах, а для мутанта L721A

уровень экспрессии составлял 33% при 100%-ной консервативности (табл. 1, рис. 1).

В М8 консервативность изучаемых аминокислотных остатков в целом ниже, чем в сегменте М6: для остатков Phe-796, Leu-801 и Leu-807 она составляет 100% у аскомицетов, включая РМА1 АТФазу базидиомицета *U. maydis*, причем остаток Leu-807 консервативен и в последовательностях базидиомицетов, водорослей (кроме *Dunaliella bioculata*) и растений (табл. 2, рис. 2). Остальные остатки консервативны на 44–98% (табл. 2, рис. 2): Іле-794 – на 44% (21 Іле, 24 Val, 3 Met), Іле-797 – на 98% (47 Іле, 1 Phe), Gln-798 – на 63% (30 Gln, 18 Glu), Іле-799 – 90% (43 Іле, 5 Val). Гомологичность остатков в М8 для аскомицетов сходна с таковой в М6 и составляет 100% в РМА1 аскомицетов и *U. maydis*, за исключением Іле-794 (94%) и Іле-797 (98%). В АТФазах базидиомицетов, водорослей и растений также наблюдается высокая гомология (91–100%): Іле-794 – 91%, Phe-796 – 100%, Leu-797 – 96%, Gln-798 – 98%, Іле-799 – 98%, Leu-801 – 98% (рис. 2). При этом биогенез данных мутантных форм ферментов был практически блокирован у I794A, F796A, Q798A и I799A или значительно снижен для L797A, L801A и I807A. Соответственно, АТФазная активность данных мутантов, за исключением L797A, была на остаточном уровне (табл. 2). В случае L797A активность, хотя и была низкой, но позволяла проводить более детальные исследования. Несмотря на низкие экспрессию и активность, по своим свойствам этот мутант был близок дикому типу. Поскольку процедура выделения секреторных везикул требовала теплового шока, было предположено, что наблюдающиеся отклонения от нормы связаны с использованием повышенной температуры (39°C). Поэтому было решено изучить влияние этих мутаций на уровне плазматической мембраны в отсутствие теплового шока.

Мутантные ферменты в плазматической мембране. Для этого мутации были внесены в хромосомную копию гена *PMA1*, для чего сначала мутацию вносили во фрагмент этого гена *BgIII-SalI* (519 п.н.), а затем переносили в плазмиду pVP3, из которой с помощью эндонуклеазы *HindIII* вырезали линейный участок *HindIII-HindIII* (6.1 т.п.н.), которым с помощью набора для трансформации Alkali Cation Yeast Transformation (“Bio101”, США) трансформировали клетки штамма NY13 и высевали их на селективную среду. После отбора выросших колоний из них экстрагировали хромосомную ДНК для подтверждения наличия мутаций. Из всех десяти изучаемых мутантов сегмента М6, потерявших активность, на селективной среде был способен расти только один мутант, содержащий F728A, все остальные не выживали (табл. 1), или выросшие колонии были revertантными и содержали ген *PMA1* дикого типа (не иллюстрируется). Таким

	H ⁺
<i>Saccharomyces cerevisiae PMA1</i>	721- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Saccharomyces uvarum</i>	719- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	719- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	719- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Saccharomyces bayanus</i>	719- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Saccharomyces eubayanus</i>	719- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Saccharomyces arboricola</i>	720- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	722- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Lachancea thermotolerans</i>	704- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Kluyveromyces lactis</i>	702- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	702- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Kazachstania africana</i>	703- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Kazachstania naganishi</i>	720- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Naumovozima dairenensis</i>	711- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Millerozyma farinosa</i>	700- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	706- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Ogatae parapolymorpha</i>	700- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Pichia angusta</i>	700- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Pichia stipitis</i>	699- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Komagataella pastoris</i>	699- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Candida dublinensis</i>	698- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Candida albicans</i>	698- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Candida glabrata</i>	705- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Candida orthopsis</i>	702- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Candida parapsilosis</i>	701- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	710- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	727- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	723- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	719- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>	728- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Yarrowia lipolytica</i>	721- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Tetrapisispora blattae</i>	718- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Tetrapisispora phaffii</i>	711- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	701- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Debaryomyces hansenii</i>	699- LIVFIALFADVATLAIAYD
<i>Spathaspora passalidarum</i>	698- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Torulospora delbrueckii</i>	709- LIVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Ashbya gossipii</i>	702- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Neurospora crassa</i>	721- LVVFIAIFADVATLAIAYD
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	718- LVVFIAIFADIATLAIAYD
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	722- LVVFIAIFADIATLAIAYD
<i>Aspergillus niger</i>	718- LVVFIAIFADIATLAIAYD
<i>Aspergillus nidulans</i>	766- LIVFIALFADIATLAVAYD
<i>Aspergillus fischerianus</i>	764- LVVFIALFADIATLAVAYD
<i>Aspergillus clavatus</i>	764- LIVFIALFADIATVIAYD
<i>Aspergillus fumigatus</i>	773- LVVFIALFADIATVIAYD
<i>Leptosphaeria maculans</i>	777- LIVFIALFADIATVAVAYD
<i>Ustilago maydis PMA1</i>	754- LIVFIALFADVATIAIAYD
<i>Ustilago maydis PMA2</i>	717- MVLIAFLNDGSIMTLSLD
<i>Filobasidiella neoformans</i>	746- LIIFIAVLNDGTIMTLSLD
<i>Uromyces fabae</i>	714- FMVLVALNNDGTIMTLSLD
<i>Glomus mosseae</i>	711- LLILIAILNDAATIVISVD
<i>Phytophthora infestans</i>	686- LVVLILAILNDGTILTISKD
<i>Dunaliella bioculata</i>	702- LIVIMAVFNDGAMIALSKD
<i>Cyanidium caldarium</i>	727- LVLILAYLNDGTIMTISKD
<i>Arabidopsis thaliana AHA2</i>	708- MVLIAILNDGTIMTISKD

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей трансмембранных сегментов М6 PMA1 H⁺-АТФаз дрожжей *S. cerevisiae* и H⁺-АТФаз плазматических мембран различных грибов, водорослей и растений. Жирным шрифтом и серым цветом выделены аминокислотные остатки сегмента М6 PMA1 H⁺-АТФазы *S. cerevisiae* и идентичные им аминокислотные остатки в других АТФазах, жирным шрифтом – гомологичные остатки. Большим размером отмечены Asp-730 и Asp-739.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PMA1	791- MNGIMFLQISLTENWLIFITR
<i>Saccharomyces uvarum</i>	789- MNGIMFLQISLTENWLIFITR
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	789- MNGIMFLQISLTENWLIFITR
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	789- MNGIMFLQISLTENWLIFITR
<i>Saccharomyces bayanus</i>	789- MNGIMFLQISLTENWLIFITR
<i>Saccharomyces eubayanus</i>	789- MNGIMFLQISLTENWLIFITR
<i>Saccharomyces arboricola</i>	790- LNGIMFLQISLTENWLIFITR
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	792- LNGIMFLQISLTENWLIFITR
<i>Lachancea thermotolerans</i>	774- IDGVLFQISLTENWLIFITR
<i>Kluyveromyces lactis</i>	772- IDGVLFQISLTENWLIFITR
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	772- IDGVLFQISLTENWLIFITR
<i>Kazakhstania naganishii</i>	780- IDGVLFQISLTENWLIFITR
<i>Kazakhstania africana</i>	773- IDGVMLFQISLTENWLIFVTR
<i>Naumovozima dairenenensis</i>	781- IDGIMFLQISLTENWLIFVTR
<i>Millerozima farinosa</i>	770- LDGVLFQISLTENWLIFVTR
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	776- VDGVLFQISLTENWLIFVTR
<i>Ogataea parapolymorpha</i>	770- IDGVLFQISLTENWLIFVTR
<i>Pichia angusta</i>	771- VGVLFLQISLTENWLIFVTR
<i>Pichia stipitis</i>	769- IDGILFLQISLTENWLIFVTR
<i>Komatogella pastoris</i>	769- VGVLFLFLEISLTENWLIFVTR
<i>Candida dublinensis</i>	768- LDGILFLQISLTENWLIFVTR
<i>Candida albicans</i>	768- LDGILFLQISLTENWLIFVTR
<i>Candida glabrata</i>	774- IDGVLFQISLTENWLIFVTR
<i>Candida orthopsis</i>	773- IDGILFLQISLTENWLIFVTR
<i>Candida parapsilosis</i>	771- IDGILFLQISLTENWLIFVTR
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	780- IDGVLFLEISLTENWLIFITR
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	797- IDGVLFLEISLTENWLIFVTR
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	793- IDGILFLEISLTENWLIFITR
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	791- QDEVLFLEISLTENWLIFVTR
<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>	797- IDGVLFLEISLTENWLIFVTR
<i>Yarrowia lipolytica</i>	788- RDPILFLQISLTENWLIFITR
<i>Tetrapisispora blattae</i>	779- IDGVMFLEISLTENWLIFITR
<i>Tetrapisispora phaffii</i>	781- IDGVIFFEISLTENWLIFITR
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	771- IDGVLFQISLTENWLIFVTR
<i>Debaryomyces hansenii</i>	768- LDGILFLQISLTENWLIFITR
<i>Torulospora delbrueckii</i>	781- IDGVIFLEISLTENWLIFVTR
<i>Spathaspora passalidarum</i>	768- LDGILFLQISLTENWLIFVTR
<i>Ashbya gossypii</i>	772- IDHIMFLEISLTENWLIFITR
<i>Neurospora crassa</i>	793- MDEVLFQISLTENWLIFITR
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	789- THPVLFLEISLTENWLIFITR
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	794- VDAVMFLEISLTENWLIFITR
<i>Aspergillus niger</i>	790- RDEVLFLEISLTENWLIFITR
<i>Aspergillus nidulans</i>	836- PQPMFLFLEVSLETENWLIFVTR
<i>Aspergillus fischerianus</i>	834- PQEMIFLEVALTENWLIFVTR
<i>Aspergillus clavatus</i>	833- PQEILFLEVALTENWLIFVTR
<i>Aspergillus fumigatus</i>	893- PQEMIFLEVALTENWLIFVTR
<i>Leptosphaeria maculans</i>	857- IQPILFLEVALTENWLIFVTR
<i>Ustilago maydis</i> PMA1	824- TQEILFLEVSLETENWLIFITR
<i>Ustilago maydis</i> PMA2	797- LHMIMYLQVAILAQALIFVTR
<i>Filobasidiella neoformans</i>	822- GHMIVIYLQVAIISQALIFVTR
<i>Uromyces fabae</i>	791- VHMIYLQVAIISQALIFVTR
<i>Glomuss mosseae</i>	784- LHTVMYLHISSAPHFLIFATR
<i>Phytophthora infestans</i>	930- LRSLVYLQVSISGQALIFVTR
<i>Dunaliella bioculata</i>	847- TRSILYIYTQVSISGQALVFVVR
<i>Cyanidium caldarium</i>	800- LHSIIYLQASIIGQALIFVTR
<i>Arabidopsis thaliana</i> AHA2	786- LMGAVYLYQVSIISQALIFVTR

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей трансмембранных сегментов M8 PMA1 H⁺-АТФазы дрожжей *S. cerevisiae* и H⁺-АТФаз плазматических мембран различных грибов, водорослей и растений. Жирным шрифтом и серым цветом выделены Ile-794, Phe-796, Leu-797, Gln-798, Ile-799, Leu-801, Glu-803, Ile-807 и соответствующие им аминокислотные остатки в других АТФазах, жирным шрифтом — гомологичные остатки. Большим размером отмечен Glu-803.

Объект	Транспортируемый катион	Аминокислотная последовательность
Трансмембранный сегмент M6		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PMA1	H ⁺	721-LIVFTAIFADVATLAIAYD
Кроличья SERCA1a	Ca ²⁺	791-QLLWVNVLVT D GLPATALGF N
Крысиная PMCA1	Ca ²⁺	886-QMLWVN LIM DTLASLALATE
Человеческая НКА	H ⁺ /K ⁺	815-TILFIELCT D IFPSVSLAYE
Овечья НКА	Na ⁺ /K ⁺	804-TILCIDLGT D MVPAISLAYE
Трансмембранный сегмент M8		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PMA1		791-MNGIMFLQ I SLTE N WLIFITR
Кроличья t PMCA1		959-HYTIV F NTF V LMQ L FNEINAR
Крысиная SERCA1		896-PMT V ALSV L VTI E MCNALNSL
Человеческая НКА		926-TCYTVFF F SIEMC Q IADVL R
Овечья НКА		920-TCHTAFFV S I V V Q WADLVIC

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей трансмембранных сегментов M6 и M8 PMA1 H⁺-АТФазы *S. cerevisiae* и Ca²⁺-, H⁺, K⁺- и Na⁺, K⁺-АТФаз животных. Жирным шрифтом и серым цветом выделены аминокислотные остатки сегментов M6 и M8 PMA1 H⁺-АТФазы *S. cerevisiae* и идентичные им аминокислотные остатки в других АТФазах, жирным шрифтом – гомологичные остатки. См. также подписи к рис. 1 и 2.

образом, девять из десяти мутаций были летальными и на уровне плазматической мембраны. Это подчеркивает важность заменяемых остатков в M6 для нормального функционирования фермента. Что касается активного мутанта F728A, его ростовые характеристики мало отличались от таковых дикого типа (табл. 3), а сама мутантная АТФаза F728A была экспрессирована на уровне дикого типа (107%) и обладала активностью несколько меньшей, чем у дикого типа (81%, табл. 1).

В случае M8 для интегрирования в хромосому было использовано 6 сегментов *HindIII–HindIII*, несущих мутации I794A, F796A, L797A, Q798A, I799A и L801A; замену I807A не использовали, т.к. она была близка по характеристикам к мутациям L797A и L801A. Из этих 6 неактивных или малоактивных в секреторных везикулах мутаций две остались летальными и при их экспрессии в плазматических мембранах – Q798A и I799A: даже при пермиссивной температуре они не поддерживали рост (табл. 2). На этом этапе мы решили выбрать для дальнейшего исследования единственный жизнеспособный из испытуемых штаммов в M6 – F728A – и параллельно такую же аланиновую замену фенилаланильного остатка в M8 – F796A. Ростовые характеристики этого мутанта были ниже на 20% по сравнению с диким типом (табл. 3), экспрессия мутантного белка F796A в плазматических мембранах была достаточно высока и составляла 72% от уровня дикого типа, но АТФазная активность снижалась в 4 раза (табл. 2). Это предполагает, что остаток Phe-796 может быть непосредственно вовлечен в функционирование фермента.

Интересно, что консервативность остатков Phe-728 и Phe-796 практически идентична: они присутствуют в PMA1 АТФазах аскомицетов и PMA1 АТФазе базидиомицета *U. maydis* (рис. 1, 2). В то же время гомологичные Phe-796 остатки Тгу присутствуют в АТФазах базидиомицетов, водорослей и низших растений (рис. 2) и даже в кальциевых АТФазах дрожжей (PMR1) и животных (PMCA1) и в натрий-калиевых НКА и протон-калиевых НКА АТФазах животных (рис. 3). Остаток, идентичный Phe-728, отсутствует во всех АТФазах, кроме аскомицетных (за исключением остатка Phe-818 в НКА H⁺, K⁺-АТФазе; рис. 3).

Влияние мутаций F728A и F796A на регуляцию PMA1 H⁺-АТФазы. H⁺-АТФаза плазматических мембран дрожжей обладает выраженной способностью активироваться, когда клетка метаболизирует глюкозу, а также другие сбраживаемые сахара (Окороков, Петров, 1986; Serrano, 1983; Sychrova, Kotyk, 1985). При добавлении глюкозы к клеткам

Таблица 3. Влияние мутаций F728A и F796A на рост штаммов *S. cerevisiae* NY13

Штамм	G	A
Дикий	2.3	8.5
F728A	2.4	8.3
F796A	2.9	6.9

Примечание. G – время удвоения (ч); A – максимальная оптическая плотность (OD₆₀₀) в стационарной фазе. Представлены данные из 2–4 опытов.

дрожжей происходит увеличение активности фермента в несколько раз. Таким образом, было логично изучить влияние мутаций F728A и F796A на функционирование и регуляцию PMA1 H⁺-АТФазы. Для этого штаммы NY13, несущие ген *PMA1* дикого типа или мутантный, выращивали как обычно до середины логарифмической фазы, осаждали, промывали дистиллированной водой, ресуспендировали в ней же, делили на две части, к одной из которых добавляли глюкозу до конечной концентрации 2% и инкубировали 30 мин при постоянном перемешивании при 30°C. По окончании инкубации клетки осаждали, фракционировали, как указано в разделе "Материалы и методы исследования", и использовали получаемые плазматические мембранны для определения экспрессии и АТФ-гидролазной активности фермента (табл. 4).

На экспрессию ферментов дикого типа и мутантных не влияла инкубация с глюкозой. Уровень экспрессии был близок в голодящих и ферментирующих клетках: в случае активно росших мутантов экспрессия составляла 107% для F728A (табл. 1) и 72% для F796A (табл. 2), экспрессия в условиях голодаания для тех же мутантов была 105 и 71%, а в условиях сбраживания глюкозы 101 и 76% соответственно (табл. 4). Во всех случаях фермент, несущий мутацию F796A, был экспрессирован почти на 30% меньше (табл. 2, 4), что указывало на большую чувствительность белка к этой мутации по сравнению с F728A. Мутантный белок F728A во всех случаях был экспрессирован на уровне дикого типа и даже немного выше (табл. 1, 4). Что касается АТФ-гидролазной активности мутанта, в активно растущих клетках она была на 20% ниже таковой родительского типа (табл. 1). В условиях голодаания активность штамма F728A была равна таковой дикого типа, но при сбраживании глюкозы по сравнению с диким типом она снижалась на 40% (табл. 4). Влияние мутации F796A более выражено: кроме сниженной экспрессии фермент обладал и сниженной активностью: в 4 раза при активном росте и в 2 раза в условиях, когда после периода голодаания начиналось ферментирование глюкозы. Кроме этого, на 40% снижалась

и степень активации мутантных ферментов: PMA1 АТФаза дикого типа активировалась в 3.6–5.8 раза, F728A – в 3.3 раза, а F796A – в 2.2 раза (табл. 4).

Роль остатков Phe-728 и Phe-796. Заключение.

PMA1 H⁺-АТФаза синтезируется в эндоплазматическом ретикулоне и в процессе созревания достигает секреторных везикул, которые доставляют фермент к плазматической мембране, сливаясь с ней. На этих стадиях имеются по крайней мере два пункта контроля качества; при этом фермент с серьезным нарушением фолдинга не достигает секреторных везикул и отбраковывается (Ambesi et al., 2000; Ferreira et al., 2002). Мы использовали систему, позволяющую экспрессировать в секреторных везикулах даже неактивные мутанты, не имеющие, однако, существенных нарушений фолдинга. Из представленных в данном исследовании десяти мутантных ферментов в сегменте M6 семь отбраковывалось на поздних стадиях биогенеза, очевидно, при слиянии секреторных везикул с плазматическими мембранами: секреторных везикул достигало от 15% (I725A) до 87% (Y738A) мутантных ферментов (табл. 1), но плазматических мембран достигал один фермент с заменой F728A. Лишь в двух случаях (D730A и D739A) наблюдался полный блок в биогенезе на ранних его этапах. Такое поведение типично для белка с серьезными дефектами фолдинга, вызывающими задержание дефектного белка в эндоплазматическом ретикулоне (Ferreira et al., 2002). Веское подтверждение этому было получено в опытах с плазматическими мембранами: мутации D730A и D739A были нежизнеспособными и не экспрессировались на уровне плазматической мембраны. Более того, все остальные мутации, кроме F728A, приводившие к потере активности, но не экспрессии, также оказывались летальными, даже несмотря на достаточную степень экспрессии мутантов в секреторных везикулах. Это свидетельствовало об их значимости для структурно-функциональной организации фермента и возможном непосредственном участии в реакционном цикле. В случае же F728A, вероятно, под воздействием теплового шока происходило нарушение экспрессии за счет изменений во взаимодействии мутантного

Таблица 4. Влияние мутаций F728A и F796A на экспрессию и активность PMA1 АТФазы при сбраживании глюкозы (+) клетками *S. cerevisiae* и в условиях их голодаания (–) в %

Штамм	Экспрессия		АТФазная активность		Степень активации АТФазы
	–	+	–	+	
Дикий	100	99	100*	580	5.8
F728A	105	101	106	349	3.3
Дикий	100	102	100**	357	3.6
F796A	71	76	84	187	2.2

Примечание. 100% АТФазной активности соответствовали 1.95 (*) или 3.74 (**) мкмоль *P_i*/мин на 1 мг белка. Представлены средние данные из 2–10 опытов.

белка с липидным микроокружением и/или другими белками. Следует также учесть, что PMA1 H^+ -АТФаза может образовывать гексамеры, в которых домены одного мономера могут взаимодействовать как с одинаковыми, так и разными доменами другого мономера (Heit et al., 2021; Zhao et al., 2021; Young et al., 2024), поэтому мутации могут влиять и на взаимодействие мономеров PMA1 АТФазы между собой. При устраниении же теплового шока влияние мутации нивелировалось, и ее эффект проявлялся в небольшом снижении активности и более выраженном уменьшении степени активации мутантной АТФазы.

Схожая с заменами D730A и D739A картина была в случае мутантных ферментов в M8, экспрессируемых в секреторных везикулах: у I794A, F796A, Q798A и I799A наблюдался практически полный блок в биогенезе (0–7%; табл. 2), у L797A, L801A и I807A уровень экспрессии был критический (16–17%); лишь в случае мутанта L797A было возможно проведение более детальных исследований с использованием секреторных везикул. Вместе с тем при экспрессировании мутантных белков в плазматических мембранах мутации Q798A и I799A оставались летальными, в то время как остальные мутантные белки были экспрессированы на уровне 35–88% и обладали активностью от 14 до 65%.

В целом сегмент M6 содержит больше консервативных аминокислотных остатков, замены которых в половине случаев приводят к синтезу неактивных ферментов, достигающих секреторных везикул (за исключением D730A и D739A). В случае активных ферментов второй половины (V723A, A726S, A729S, V731A, A732S, T733A, A735S, I736A, A737S) у шести из них (V723A, A726S, A729S, A732S, T733A, I736A) имеются выраженные отклонения в кинетике гидролиза АТФ и/или в его сопряжении с транспортом H^+ (Miranda et al., 2011). Таким образом, замены только трех остатков из 19 не приводят к нарушению структурно-функциональной организации PMA1 АТФазы; по своим свойствам замены этих остатков (V731A, A735S, A737S) близки к таковым дикого типа (Miranda et al., 2011). Можно смело предположить, что именно эта уникальная последовательность аминокислотных остатков в M6 обеспечивает специфичность ионного транспорта; в первую очередь, эта специфичность зависит от остатка Asp-730 или находящихся в этой позиции аспартильных остатков в Ca^{2+} , Mn^{2+} -АТФазе дрожжей (PMR1; Mandal et al., 2000) и H^+ -АТФазе растений (ANA2; Buch-Pedersen, Palmgren, 2003). Очевидно, что присутствие остальных аминокислотных остатков M6 (в первую очередь тех, замены которых приводят к исчезновению активности) нормализует фолдинг и функционирование PMA1 H^+ -АТФазы.

Что касается сегмента M8, то в нем нет остатков, вызывавших потерю активности без блокирования

биогенеза: подавление экспрессии приводило к падению активности, которое, как правило, было более выражено по сравнению с изменением экспрессии (табл. 2). Блокирование биогенеза мутантов I794A, F796A, Q798A, I799A на стадиях до достижения ими секреторных везикул происходит, очевидно, за счет нарушения фолдинга, о чем свидетельствуют данные трипсинолиза: мутантные белки, содержащие эти замены, гораздо чувствительнее к действию трипсина, чем дикий тип (Guerra et al., 2007). Об этом свидетельствует и дополнительный мутант в позиции Gln-798 – Q798E, с заменой Gln на гомологичный Glu (Guerra et al., 2007), чьи экспрессия и активность мало чем отличаются от таковых дикого типа, что позволяет заключить, что фолдинг этого фермента также мало отличается от дикого типа. Очевидно, нарушения фолдинга в случае L801A и I807A менее выражены, но приводят к существенному падению экспрессии и активности. Следует предположить, что нарушение фолдинга вышеуказанных белков усугубляется действием теплового шока, очевидно, приводящего к нарушению взаимодействия различных частей фермента между собой и/или липидным микроокружением. Об этом свидетельствуют данные по экспрессии мутантных белков в плазматических мембранах в условиях отсутствия теплового шока (табл. 2, 4).

При экспрессии мутантных ферментов в плазматических мембранах две замены – Q798A и I799A – остаются летальными, что указывает на их существенное влияние на организацию фермента: в первую очередь, структурную, но также, вероятно, и функциональную составляющую, что предполагает прямое вовлечение остатков Gln-798 и Ile-799 в транспортные процессы и сопряжение гидролиза АТФ и транспорта H^+ . Чрезвычайно интересно, что замены остатков в M8 в семи позициях вызывали изменения в сопряжении H^+ -АТФазы; в большинстве случаев это было частичное разсопряжение на 50–90%, но в двух случаях это проявлялось в сверхсопряжении в 2–3 раза (S800A и E803Q; Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007). При этом замены в позиции Glu-803 приводили к самым разнообразным эффектам: от блока в биогенезе (E803S и E803L) до появления экспрессированных на 24–93%, но неактивных форм фермента (E803D, E803C, E803R), а в активных мутантных ферментах от почти полного разсопряжения (E803A) до почти трехкратного сверхсопряжения (E803Q; Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007; Петров, 2010).

Что касается исследуемого остатка Phe-796, его роль проявляется в поддержании нормально-го фолдинга фермента, особенно в условиях теплового шока, нарушающего взаимодействие различных доменов АТФазы между собой как внутри мономера, так и в различных частях гексамиера (Heit et al., 2021). Безусловно, нарушение фолдинга должно приводить и к нарушению взаимодействия

молекулы фермента с его липидным микроокружением. Следует также отметить, что глюкозо-зависимая активация/регуляция PMA1 АТФазы тесно связана в основном с обратимым специфическим фосфорилированием остатков Ser-911 и Thr-912 (Lecchi et al., 2005, 2007; Mazon et al., 2015); очень вероятно, имеются и другие остатки Ser и Thr, вовлеченные в этот феномен (Chang, Slayman, 1991; Петров, 2023). Изучаемые остатки Phe-728 и Phe-796 являются нефосфорилируемыми, поэтому действие их замен на глюкозо-зависимое активирование АТФазы не является специфическим; вероятно, оно обусловлено нарушением фолдинга и/или взаимодействия отдельных доменов фермента между собой. Дальнейшие исследования могли бы выявить более полную и детальную картину структурно-функциональной организации PMA1 H^+ -АТФазы дрожжей и грибов – важных объектов пищевой промышленности, биотехнологии и медицины.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Окороков Л.А., Петров В.В. Выделение везикул плазматических мембран дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*, пригодных для исследования транспорта веществ // Биол. мембранны. 1986. Т. 3. С. 549–556.

Петров В.В. Точечные мутации в Pma1 H^+ -АТРазе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: влияние на ее экспрессию и активность // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 1070–1080.

Petrov V.V. Point mutations in Pma1 H^+ -ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: influence on its expression and activity // Biochemistry (Moscow). 2010. V. 75. P. 1055–1170.

Петров В.В. Роль петли L5-6, соединяющей мембранные сегменты M5 и M6, в биогенезе и функционировании Pma1 H^+ -АТРазы дрожжей // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 41–58.

Petrov V.V. Role of loop L56 connecting transmembrane segments M5 and M6 in biogenesis and functioning of yeast Pma1 H^+ -ATPase // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 31–41.

Петров В.В. Влияние мутаций в экстракитозольном домене H^+ -АТФазы плазматической мембраны дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на ее активность и регуляцию // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 329–334.

Petrov V.V. Effect of mutations in the extracytosolic domain of the *Saccharomyces cerevisiae* H^+ -ATPase on its activity and regulation // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 468–473.

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.

Andersen J.P., Vilsen B. Amino acids Asn796 and Thr799 of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum bind Ca^{2+} at different sites // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 15931–15936.

Asano S., Io T., Kimura T., Sakamoto S., Takeguchi N. Alanine-scanning mutagenesis of the sixth transmembrane segment of gastric H^+, K^+ -ATPase alpha-subunit // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 31265–31273.

Axelsen K.B., Palmgren M.G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily // J. Mol. Evol. 1998. V. 46. P. 84–101.

Bensadoun A., Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials // Anal. Biochem. 1976. V. 70. P. 241–250.

Buch-Pedersen M.J., Venema K., Serrano R., Palmgren M.G. Abolishment of proton pumping and accumulation in the E1P conformational state of a plant plasma membrane H^+ -ATPase by substitution of a conserved aspartyl residue in transmembrane segment 6 // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 39167–39173.

Buch-Pedersen M.J., Palmgren M.G. Conserved Asp684 in transmembrane segment M6 of the plant plasma membrane P-type proton pump AHA2 is molecular determinant of proton translocation // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 17845–17851.

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.

Ferreira T., Mason A.B., Pypaert M., Allen K.E., Slayman C.W. Quality control in the yeast secretory pathway: a misfolded PMA1 H^+ -ATPase reveals two checkpoints // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 21027–21040.

Fiske C.H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. 1925. V. 66. P. 375–400.

Heit S., Geurts M.M.G., Murphy B.J., Corey R.A., Mills D.J., Kühlbrandt W., Bublitz 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>

Hermsen H. P., Koenderink J. B., Swarts H. G. P., De Pont J.J. The negative charge of glutamic acid-795 is essential for gastric H^+, K^+ -ATPase activity // Biochemistry. 1998. V. 39. P. 1330–1337.

Hermsen H. P., Swarts H. G. P., Koenderink J. B., De Pont J.J. The carbonyl group of glutamic acid-820

- in the gastric H⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit is essential for K⁺ activation of the enzyme activity // Biochem. J. 2000. V. 331. P. 465–472.
- 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.
- Jewell-Motz E.A., Lingrel J.B.* Site-directed mutagenesis of the Na,K-ATPase: consequences of substitutions of negatively-charged amino acids localized in the transmembrane domains // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 13523–13530.
- Kanai R., Ogawa H., Vilse B., Cornelius F., Toyoshima C.* Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1P state // Nature. 2013. V. 502. P. 201–206.
- Kuntzweiler T.A., Arguello J.M., Lingrel J.B.* Asp804 and Asp808 in the transmembrane domain of the Na,K-ATPase a subunit are cation coordinating residues // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 29682–29687.
- 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.
- Lutsenko S., Kaplan J.H.* Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 15607–15613.
- Mandal D., Woolf T.B., Rao R.* 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. 2000. V. 275. P. 23933–23938.
- Mazon M.J., Eraso P., Portillo F.* Specific phosphoantibodies reveal two phosphorylation sites in yeast Pma1 in response to glucose // FEMS Yeast Research. 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.
- Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S., Sorensen T.L., Petersen J., Andersen J.P., Vilse B., Nissen P.* Crystal structure of the sodium-potassium pump // Nature. 2007. V. 450. P. 1043–1049.
- Morsomme P., Slayman C.W., Goffeau A.* Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1469. P. 133–157.
- Nakamoto R.K., Rao R., Slayman C.W.* Expression of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 7940–7949.
- Nielsen J.M., Pedersen P.A., Karlsh S.J.D., Jørgensen P.L.* Importance of intramembrane carboxylic acids for occlusion of K⁺ ions at equilibrium in renal Na,K-ATPase // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 1961–1968.
- Nyblom M., Poulsen H., Gourdon P., Reinhard L., Andersson M., Lindahl E., Fedosova N., Nissen P.* Crystal structure of Na⁺, K⁺-ATPase in the Na⁺-bound state // Science. 2013. V. 342. P. 123–127.
- Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C.* Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 13742–13747.
- Pedersen B.P., Buch-Pedersen M., Morth J.J.P., Palmgren M.G., Nissen P.* Crystal structure of the plasma membrane proton pump // Nature. 2007. V. 450. P. 1111–1114.
- 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. Dyn. 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.
- Petrov V.V., Slayman C.W.* Site-directed mutagenesis of the yeast PMA1 H⁺-ATPase. Structural and functional role of cysteine residues // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 28535–28540.
- Rice W.J., MacLennan D.H.* 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. 1996. V. 271. P. 31412–31419.
- Robles-Martinez L., Pardo J.P., Miranda M., Mendez T.L., Matus-Ortega M.G., Mendoza-Hernandez G., Guerra-Sanchez G.* The basidiomycete *Ustilago maydis* has two plasma membrane H⁺-ATPases related to fungi and plants // J. Bioenerg. Biomembr. 2013. V. 45. P. 477–490.
- Serrano R.* In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase // FEBS Lett. 1983. V. 156. P. 11–14.
- Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyosima C.* Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution // Nature. 2009. V. 459. P. 446–450.
- Syrova H., Kotyk A.* Conditions of activation of yeast plasma membrane ATPase // FEBS Lett. 1985. V. 183. P. 21–24.
- Takahashi M., Kondou Y., Toyoshima C.* Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 5800–5805.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence

- alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 4673–4680.
- Toyoshima C., Iwasawa S., Ogawa H., Hirata A., Tsueda J., Inesi G.* Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg²⁺-bound E1 state // Nature. 2013. V. 495. P. 260–264.
- Toyosima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H.* Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution // Nature. 2000. V. 405. P. 647–655.
- Toyosima C., Nomura H.* Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium // Nature. 2002. V. 418. P. 605–611.
- Toyoshima C., Norimatsu Y., Iwasawa S., Tsuda T., Ogawa H.* How processing of aspartylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium pump // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 19831–19836.
- Vilsen B., Andersen J.P.* 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. 1998. V. 37. P. 10961–10971.
- Wei Y., Chen J., Rosas G., Tompkins D.A., Holt P.A., Rao R.* Phenotypic screening of mutations in Pmr1, the yeast secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, reveals residues critical for ion selectivity and transport // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 23927–23932.
- Young M.R., Heit S., Bublitz M.* Structure, function and biogenesis of the fungal proton pump Pma1 // Biochim. Biophys. Acta. 2024. V. 1871. P. 119600.
- Zhang Z., Lewis D., Strock C., Inesi G., Nakasako M., Nomura H., Toyoshima C.* Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca²⁺ binding and catalytic activation in the Ca²⁺ transport (SERCA) ATPase // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 8758–8767.
- Zhao P., Zhao C., Chen D., Yun C., Li H., Bai L.* Structure and activation mechanism of the hexameric plasma membrane H⁺-ATPase // Nature Commun. 2021. V. 12. P. 6439–6450.

The Significance of Membrane Segments M6 and M8 in the Biogenesis and Functioning of the Yeast Pma1 H⁺-ATPase

V. V. Petrov

*FRC “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”,
Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow Region 142290, Russia
e-mail: vpetrov07@gmail.com*

Abstract. The membrane domain of PMA1 H⁺-ATPase of the yeast plasma membrane is formed by 10 transmembrane segments (M1–M10), of which segments M6 and M8 are especially important. To study them, alanine-scanning mutagenesis was used, replacing each of the residues forming the segments with alanine. The enzymes were expressed from the plasmid *pma1* gene in secretory vesicles under heat shock. In M6, half of the mutant proteins lost activity (0–7%), but were expressed at a level of 15–87% of the wild type. In M8, one third of the mutants showed a block in biogenesis (0–7%) or a significant decrease in expression (up to 16–17%), accompanied by an almost complete loss of enzymatic activity (0–10%). Since expression in secretory vesicles requires the use of elevated temperatures, the effect of mutations causing disturbance of expression and ATPase activity on the biogenesis and functioning of the enzyme in the absence of heat shock was tested by expressing them in plasma membranes from the chromosomal *PMA1* gene at a permissive temperature. In the case of M6, only one mutant (F728A) out of the ten inactive enzymes was expressed in the plasma membrane and had activity at the wild type level; the remaining mutants were nonviable. In the case of M8, only mutants Q798A and I799A were unable to express at the plasma membrane level, while I794A, F796A, L797A, and L801A were expressed by 35–89% and had an activity of 14–65% of the wild type level. The effect of mutations F728A and F796A on the structural and functional organization of PMA1 ATPase and its regulation due to glucose-dependent activation of the enzyme was compared. Both mutations reduced ATPase activity by 30–50% and the degree of its activation by 30–40%. The data allow us to conclude that substitutions in the M6 segment primarily affect the functioning of the enzyme and, to a lesser extent, its conformation and biogenesis, suggesting the participation of the studied amino acid residues in the transport process. Residues in M8, on the contrary, play a major role in ATPase biogenesis. Overall, the results confirm the important role of amino acid residues in M6 and M8 for the structural and functional organization of PMA1 H⁺-ATPase and indicate that M6 contains more residues that affect the functioning of the enzyme.

Keywords: yeast, plasma membrane, secretory vesicles, PMA1 H⁺-ATPase, membrane segments, site-directed mutagenesis, heat shock