

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 579.222+577.151.63

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕН АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ Ser-911 И Thr-912 В H⁺-АТФазе ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ЕЕ АКТИВНОСТЬ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФОСФАТОВ

© 2024 г. А. А. Томашевский^а, В. В. Петров^{а, *}

^аФИЦ “Пушинский 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 08.11.2023 г.

После исправления 28.11.2023 г.

Принята к опубликованию 22.12.2023 г.

Жизненно важный фермент метаболизма дрожжей H⁺-АТФаза плазматической мембраны (PMA1) фосфорилируется в процессе фолдинга и функционирования. Основными сайтами фосфорилирования являются Ser-911 и Thr-912 в С-концевом регуляторном домене. В работе использовали дикуую и мутантные формы фермента с заменами этих аминокислотных остатков на Ala или Asp для определения их роли в функционировании АТФазы и распределении полифосфатов (полиР) по фракциям. На целых клетках определяли ростовые параметры, содержание АТФ и распределение полиР *in situ*. Для определения АТФазной активности *in vitro* выделяли плазматические мембраны, содержащие фермент дикого типа и мутантные формы. Мутанты S911D, T912D и S911D/T912A обладали АТФазной активностью, близкой к дикому типу; мутант S911A обладал повышенной активностью. Скорость роста штаммов S911D, T912D и S911D/T912A была ниже в 2.0–3.0 раза, чем у дикого типа, у S911A скорость роста была близкой дикому типу. Мутации S911D и S911D/T912A вызывали снижение содержания АТФ в 2.0–2.5 раза. Все замены влияли на распределение полиР по фракциям. Влияние зависело от химической природы замены: в случае замены на Asp, меняющей тип фосфосайта, происходило уменьшение фракции полиР1 и увеличение фракции полиР2; при замене на Ala, удаляющей фосфосайт, эффект был противоположный. Содержание фракции полиР3 увеличивалось у всех мутантов. Данные указывают на то, что остатки Ser-911 и Thr-912 важны не только для нормального функционирования PMA1 H⁺-АТФазы, но и для регулирования фосфорного и энергетического метаболизма.

Ключевые слова: полифосфаты, PMA1 H⁺-АТФаза, плазматическая мембрана, *Saccharomyces cerevisiae*, дрожжи

DOI: 10.31857/S0026365624030138

В дополнение к главному источнику энергии — АТФ, клетки дрожжей (и многих других микро- и макроорганизмов) содержат неорганические полифосфаты (полиР), макроэргические соединения, которые когда-то считали просто хранилищем фосфата (Kulaev et al., 2004; Кулаев и соавт., 2005). Сейчас ясно, что функции этих ортофосфатных полимеров гораздо более сложны и разнообразны. Как написано в одной из работ — “Inorganic polyphosphate is a ubiquitous polymer with myriad roles in cell and organismal physiology” (Sanchez et al., 2023). Не отвлекаясь на “мириад ролей”, заметим, что полиР являются одним из субстратов энергетического и фосфорного метаболизма (Kulaev et al., 2004) и, в частности, могут участвовать в фосфорилировании белков в бактериях (Кулаев и соавт., 2005) и дрожжах (Azevedo

et al., 2015). Вместе с тем, АТФ остается главным компонентом энергетического метаболизма и донором фосфата при фосфорилировании; предполагается, что АТФ может использоваться для синтеза полиР (Hothorn et al., 2009) и наоборот (Beauvoit et al., 1989). Стоит отметить, однако, что взаимосвязь метаболизма АТФ и полиР и, в частности, влияние функционирования фермента, гидролизующего АТФ, на полифосфатный обмен остается мало изученным.

Таким жизненно важным ферментом дрожжевой клетки является H⁺-АТФаза плазматической мембраны (PMA1, Plasma Membrane ATPase), кодируемая геном *PMA1*, нокаут которого для клетки летален. Этот фермент является протонным насосом, который, гидролизуя АТФ, выбрасывает

протоны из клетки, создавая электрохимический градиент ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), энергия которого используется для поддержания работы систем вторичного транспорта веществ. Фермент является мономером (могущим образовывать олигомеры, см. Heit et al., 2021) с молекулярной массой около 100 кД, распределенной между пятью каталитическими доменами, один из которых является регуляторным, расположенным в цитозольной С-концевой части фермента.

Функционирование АТФазы и ее регуляция тесно связаны с метаболизмом глюкозы и других ферментируемых сахаров: при их сбраживании фермент многократно активируется (Serrano, 1983; Syhrova, Kotyk, 1985; Огороков, Петров, 1986). При этом происходит множественное регуляторное фосфорилирование молекулы PMA1 АТФазы по остаткам Ser (в основном) и Thr (Chang, Slayman, 1991). Предполагается, что в процессе созревания фермента и его внутриклеточного трафика фосфорилируются около 10 таких аминокислотных остатков, роль которых установлена только для трех (Lecchi et al., 2005, 2007; Mazon et al., 2015). Показано, что глюкозо-зависимая регуляция активности H⁺-АТФазы дрожжей в основном связана с фосфорилированием tandemно расположенных в С-концевом регуляторном домене остатков Ser-911 и Thr-912 (Lecchi et al., 2005, 2007); вовлеченность остальных потенциальных фосфосайтов в этот процесс до конца не установлена. Таким образом, представлялось важным выяснить, влияют ли замены этих фосфорилируемых остатков на активность фермента и распределение полиР — иными словами, есть ли связь между функционированием АТФазы и метаболизмом полиР.

Целью работы являлось изучение влияния точечных замен аминокислотных остатков Ser-911 и Thr-912 в С-концевом участке H⁺-АТФазы плазматической мембраны на ее активность и фосфорный метаболизм на примере полифосфатов.

Представленная работа является частью систематического исследования структурно-функциональной организации PMA1 АТФазы и энергетического обмена у дрожжей. Были использованы мутанты (табл. 1), несущие точечные замены полных остатков Ser-911 и Thr-912 на нейтральный

и нефосфорилируемый Ala (S911A и T912A) или на несущий заряд и потенциально фосфорилируемый Asp (S911D и T912D).

В первом случае фосфосайты, имеющие фосфоэфирную связь, удаляли. В последнем случае замены позволяли частично имитировать свойства фосфорилируемых Ser-911 и Thr-912 — при создании новых потенциальных фосфосайтов Asp-911 и Asp-912 происходила замена фосфоэфирной связи на ацилфосфатную. Мутант T912A не обладал достаточной активностью, поэтому вместо него изучали двойной мутант S911D/T912A. Предметом исследования были ростовые характеристики мутантов, содержание АТФ, активность АТФазы и распределение полиР по фракциям.

У использованных в работе штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* NY13 (MATa *ura3*–52) ген PMA1 контролировался нативным промотором 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 Ser-911 и Thr-912, как описано ранее (Lecchi et al., 2005). Штаммы были любезно предоставлены проф. К. И. Слейман (Йельский университет, США). Культуры дрожжей поддерживали на агаризованной среде, содержащей 2%-ную глюкозу, 6.7 г/л YNB (“Difco”, США), 20 мг/л гистидина. Штаммы дрожжей выращивали на качалке при 30°C на жидкой среде того же состава до середины логарифмической фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием, промывали водой и инкубировали с 2%-ной глюкозой. Затем клетки вновь осаждали и разрушали с использованием аппарата French Press и выделяли плазматические мембраны с использованием дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Препарат, обогащенный плазматическими мембранами, промывали 1 мМ буфером EGTA-Tris, pH 7.5, содержащим ингибиторы протеаз (2 мкг/мл хеомстатина и лейпептина, 1 мкг/мл пепстатина и апротинина) и ресуспендировали в том же буфере. Выделенные плазматические мембраны использовали для определения уровня активности. Все препаративные процедуры выполняли при 0–4°C.

Измерение активности АТФазы проводили в препаратах плазматических мембран при 30°C в 0.5 мл инкубационной смеси, содержащей 10 мМ MgSO₄, 5 мМ Na₂АТФ, 50 мМ MES-Tris pH 6.25, 5 мМ KN₃, 5 мМ фосфоенолпирувата и 50 мкг/мл пируват киназы в присутствии и в отсутствие 100 мкМ специфического ингибитора Na₃VO₄. Активность PMA1 АТФазы рассчитывали по ванадат-чувствительной части ортофосфата, образующегося при гидролизе АТФ.

Содержание АТФ определяли с помощью люциферин-люциферазного набора для определения

Таблица 1. Штаммы *S. cerevisiae*, использованные в работе

Штамм	Остаток в положении	
	911	912
Дикий	Ser	Thr
S911A	Ala	Thr
S911D	Asp	Thr
S911D/T912A	Asp	Ala
T912D	Ser	Asp

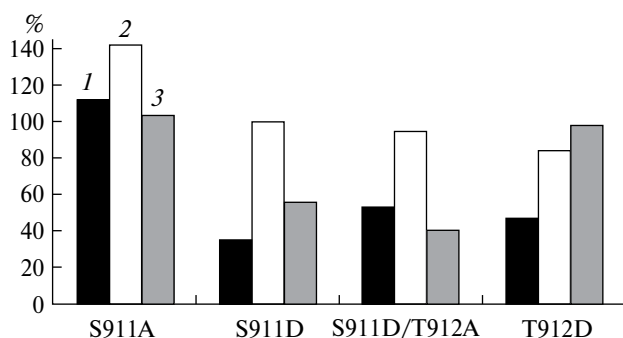


Рис. 1. Скорость роста, активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны и содержание АТФ у штаммов *S. cerevisiae* S911A, S911D, S911D/T912A и T912D в% от данных родительского штамма. Представлены средние данные из 3–6 экспериментов. 100% соответствовали: 0.17 ч^{-1} (скорость роста), $7.65 \text{ мкмоль } P_i/\text{мин}/\text{мг}$ белка (АТФазная активность), $0.95 \text{ мкмоль АТФ}/\text{г}$ сырого веса (содержание АТФ). Обозначения: 1 — скорость роста, 2 — АТФазная активность, 3 — содержание АТФ.

АТФ (“Sigma-Aldrich”, США) согласно протоколу производителя на люминометре 1250 (“LKB”, Швеция).

Фракции полиР последовательно экстрагировали из клеток, выращенных до середины логарифмической фазы роста, как описано ранее (Вагабов и соавт., 2000). Были получены короткоцепочечная кислоторастворимая фракция полиР1 (≤ 25 остатков) и среднецепочечные солерастворимая полиР2 (45–70 остатков) и щелочерастворимая полиР3 (90–115 остатков); содержание полиР этих фракций определяли по лабильному фосфору (Вагабов и соавт., 2000).

Для определения ростовых параметров штаммы выращивали на жидкой среде YNB (см. выше) при 30°C с постоянным перемешиванием на качалке. Для определения скорости роста каждый час отбирали пробы и измеряли оптическую плотность при 600 нм (OD_{600}). Все мутации, кроме S911A, заметно, в 2–3 раза, снижали скорость роста (рис. 1).

Напротив, в случае S911A скорость роста была даже немного выше, чем у дикого типа. Вместе с тем изменения OD_{600} в стационарной фазе были не так значительны (не иллюстрируется). Эти данные позволяют предположить, что внесенные мутации могут заметно влиять на энергетический/фосфорный обмен и на клеточный метаболизм в целом, однако клетка имеет механизмы, позволяющие уменьшить или даже нейтрализовать негативное влияние этих замен, что косвенно подтверждает отсутствие снижения АТФазной активности у изучаемых мутантов (см. ниже).

Чтобы оценить энергетическое состояние клетки, в тех же штаммах измеряли содержание АТФ *in situ*. Как видно из рис. 1, в двух случаях содержание АТФ не изменялось (S911A и T912D), зато

в двух других случаях содержание АТФ уменьшалось в 2–2.5 раза (S911D и S911D/T912A). Сама активность РМА1 АТФазы при этом не влияла на уровень АТФ.

Различие в действии мутаций на содержание АТФ может свидетельствовать о необратимом фосфорилировании остатка Asp-911 в мутантах S911D и S911D/T912A. В случае Asp-912 в мутанте T912D замена не влияет на содержание АТФ, а сам замененный остаток, видимо, фосфорилируется обратимо — так же, как и присутствующий в ферменте остаток Ser-911. Можно также предположить, что аспартильная замена Asp-911 при этом нарушает сопряжение гидролиза АТФ и транспорта ионов H^+ , вызывая изменение стехиометрии этого процесса и нарушая формирование $\Delta\mu_{H^+}$, как это наблюдалось при замене аминокислотного остатка Glu-803 в трансмембранном сегменте M8 (Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007). Так, замены этого остатка, являющегося частью сайта транспорта ионов H^+ , вызывали разнообразные и масштабные изменения в структурно-функциональной организации фермента: от блокирования биогенеза (E803S, E803L) или значительного подавления экспрессирования (E803D, E803C) до потери АТФ-гидролазной активности экспрессированного на уровне дикого типа фермента (E803R), и от сверхсопряжения (E803Q) до почти полного рассопряжения (E803N, E803A) этого протонного насоса (Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007).

Для того чтобы оценить, как функционирует РМА1 АТФаза, имеющая замены изучаемых остатков, *in vitro* была измерена ферментативная активность препаратов плазматических мембран, выделенных из различных штаммов после инкубации с глюкозой. Это предполагает, что фермент должен находиться в активированном состоянии. Удивительно, что, несмотря на разницу в содержании АТФ и/или скорости роста, активность АТФазы мутантных штаммов S911D, T912D и S911D/T912A незначительно отличалась от отмеченной у дикого типа; в случае S911A наблюдалось даже увеличение на 42% (рис. 1). Предполагается, что АТФаза штамма S911D является конститутивно активированной, в то время как S911A обладает повышенной активностью, но сохраняет способность дальнейшей

Таблица 2. Содержание полиР в различных штаммах *S. cerevisiae* (мкмоль P_i /г сырого веса)

Штамм	ПолиР1	ПолиР2	ПолиР3
Дикий	15.8	9.8	7.4
S911A	21.6	6.9	11.5
S911D	7.6	13.7	10.3
S911D/T912A	9.6	13.2	12.2
T912D	8.7	11.1	9.5

Примечание. Представлены средние данные из 3–8 экспериментов.

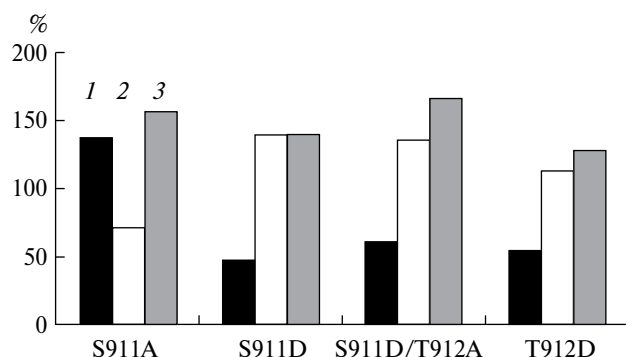


Рис. 2. Влияние мутаций S911A, S911D, S911D/T912A и T912D на распределение фракций полифосфатов в% от данных родительского штамма. Представлены средние данные из 3–8 экспериментов. 100% соответствовали: 15.8 (полиР1), 9.8 (полиР2), 7.4 (полиР3) мкмоль Р_i/г сырого веса. Обозначения: 1 — полиР1; 2 — полиР2; 3 — полиР3.

активации (Lecchi et al., 2005, 2007). Вероятно, замена Ser-911→Asp приводит к неспособности остатков Thr-912 и/или Asp-911 фосфорилироваться обратимо, в то время как замена Ser-911→Ala лишь сдвигает равновесие в процессе фосфорилирования Thr-912 и/или других потенциально фосфорилируемых остатков, в том числе пока неизвестных.

Более глубокое понимание происходящих процессов пришло из экспериментов по определению различных фракций полиР (табл. 2, рис. 2).

Ясно выраженное влияние мутаций в молекуле РМА1 АТФазы на фосфорный/энергетический метаболизм наблюдалось при распределении полиР по фракциям у различных штаммов. Фракции полифосфатов различаются по способу экстракции и длине цепи этих ортофосфорных полимеров (Kulaev et al., 2004). Существует также приближительная внутриклеточная локализация этих фракций. Так, полиР1 ассоциируется с цитозолем и в меньшей степени с вакуолями (30%); считается, что эту фракцию можно найти повсеместно. Предполагается, что полиР2 частично связана с ядром, и это кажется вероятным в связи с регуляцией полифосфатами транскрипции генов (Sanchez et al., 2023). ПолиР3, как и полиР1, ассоциируется с цитозолем и вакуолями, но это уже более высокомолекулярное соединение по сравнению с полиР1. Заметное перераспределение полиР по фракциям происходило у всех штаммов. В случае полиР1 наблюдалось увеличение этой фракции на 40% у S911A, лишенного фосфосайта Ser-911, и ее уменьшение на 40–50% в остальных случаях, где присутствовали Ser-911 или замещающий его Asp-911. В случае полиР2 происходило уменьшение доли этой фракции на треть при замене Ser-911 на остаток Ala и увеличение на 15–40% в остальных случаях, где присутствовала замена на Asp.

Если сравнивать содержание полиР1 у штамма с заменой S911A со штаммами, где присутствовала

аспартильная замена (S911D или T912D), картина была более драматичной: содержание полиР1 в клетках штамма S911A превышало обнаруженное у штаммов с заменами на Asp в 2.2–2.9 раза, в то время как содержание фракции полиР2 у тех же штаммов уменьшалось в 1.6–2.0 раза (табл. 2, рис. 2). Только в случае полиР3 происходило единообразное увеличение этой фракции на 30–65% у всех штаммов. Как кажется, чем выше молекулярная масса, тем менее метаболически лабильными должны быть фракции полиР. В действительности, однако, установлено, что наиболее меняющейся фракцией является полиР3 (Kulakovskaya et al., 2004). В случае же, рассматриваемом нами, наиболее выраженные (и имеющие противоположную направленность) изменения по фракциям вследствие мутаций происходят у фракций полиР1 и полиР2 (табл. 2, рис. 2). В целом, перераспределение фракций полиР у различных штаммов может указывать на рассогласованность процесса последовательного фосфорилирования сайтов Ser-911 и Thr-912 из-за их удаления или замены в мутантах, что приводило к нарушению связи между гидролизом АТФ и синтезом полиР. Таким образом, можно думать, что полиР являются своеобразным маркером энергетического состояния дрожжевой клетки. О подобной связи между метаболизмом АТФ и полиР сообщалось ранее (Hothorn et al., 2009). Кроме этого, полиР могут регулировать транскрипцию генов (Sanchez et al., 2023), что может сказываться на функционировании АТФазы и других ферментов.

Различие в действии замен S911A, S911D, T912A (S911D/T912A) и T912D между собой и с диким типом подтверждает, что находящиеся в этих позициях остатки Ser и Thr или замещающий эти остатки Asp могут фосфорилироваться. Вероятно, фосфорилирование молекулы АТФазы происходит за счет пула АТФ, который, в свою очередь, связан с пулом фосфатов и полифосфатов; в случае S911D и S911D/T912A фосфорилирование может являться необратимым для остатка Asp-911, на что указывает двукратное уменьшение содержания АТФ в этих штаммах (рис. 1). При этом очевидно, что хотя фосфорилироваться могут и другие остатки Ser и Thr, в частности, находящиеся в N-концевом участке фермента (Lecchi et al., 2007) или в экстрацитозольной части С-концевого участка (Петров, 2023), главными фосфосайтами являются именно Ser-911 и Thr-912, замены которых вызывают каскад последующих реакций как в функционировании РМА1 АТФазы, так и в метаболизме полиР. При удалении этих фосфосайтов или при их замене на ацилфосфатный тип происходит рассогласованность функционирования РМА1 АТФазы и нарушение распределения полиР. Следует еще раз подчеркнуть, что распределение полиР в случаях удаления фосфосайта или его замены на ацилфосфатный тип противоположно для полиР1 и полиР2. Дальнейшие исследования влияния

замен фосфорилируемых остатков помогут прояснить феноменологию происходящих процессов и выявить детали механизма регуляции энергетического/фосфорного метаболизма дрожжей и функционирования Pma1 H⁺-АТФазы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вагабов В. М., Трилисенко Л. В., Кулаев И. С. Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 414–420.
- Vagabov V. M., Trilisenko L. V., Kulaev I. S. Dependence of inorganic polyphosphate chain length on the orthophosphate content in the culture medium of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow). 2000. V. 65. P. 349–355.
- Кулаев И. С., Вагабов В. М., Кулаковская Т. В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.
- Окорочков Л. А., Петров В. В. Выделение везикул плазматических мембран дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*, пригодных для исследования транспорта веществ // Биол. мембраны. 1986. V. 3. P. 549–556.
- 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.
- Azevedo C., Livermore T., Salardi A. Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate // Mol. Cell. 2015. V. 58. P. 71–82.
- Beauvoit B., Regoulet M., Guerin B., Canioni P. Polyphosphates as a source of high-energy phosphates in yeast mitochondria: a ³¹P NMR study // FEBS Lett. 1989. V. 252. P. 17–21.
- 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., 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>
- Hothorn M., Neumann H., Lenherr E. D., Wehner M., Rybin V., Hassa P. O., Uttenweiler A., Reinhardt M., Schmidt A., Seiler J., Ladurner A. G., Herrmann C., Scheffzek K., Mayer A. Catalytic core of a membrane-associated eucaryotic polyphosphate polymerase // Science. 2009. V. 324. P. 513–516.
- Kulaev I. S., Vagabov V. M., Kulakovskaya T. V. The biochemistry of inorganic polyphosphates. Chichester: Wiley, 2004. 304 p.
- Kulakovskaya T. V., Andreeva N. A., Trilisenko L. V., Vagabov V. M., Kulaev I. S. Two exopolyphosphatases in *Saccharomyces cerevisiae* cytosol at different culture conditions // Process Biochem. 2004. V. 39. P. 1625–1630.
- 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.
- Petrov V. V., Padmanabha K. P., Nakamoto R. N., 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.
- Sanchez A. M., Garg A., Schwer B., Shuman S. Inorganic polyphosphate abets silencing of a sub-telomeric gene cluster in fission yeast // microPublication Biology. 2023. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000744>
- Serrano R. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase // FEBS Lett. 1983. V. 156. P. 11–14.
- Syhrova H., Kotyk A. Conditions of activation of yeast plasma membrane ATPase // FEBS Lett. 1985. V. 183. P. 21–24.
- 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>

SHORT COMMUNICATIONS

Effect of Substituting of Amino Acids Residues Ser-911 and Thr-912 in the Plasma Membrane H⁺-ATPase of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* on Its Activity and Distribution of Polyphosphates**A. A. Tomashevski¹, V. V. Petrov^{1, *}**¹*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences," Pushchino, 142290 Russia***e-mail: vpetrov07@gmail.com*

Received August 30, 2023; revised October 3, 2023; accepted October 3, 2023

Abstract—The vital enzyme of yeast metabolism, plasma membrane H⁺-ATPase (PMA1), is phosphorylated during folding and functioning. The main phosphorylation sites are Ser911 and Thr-912 in the C-terminal regulatory domain. The work used wild and mutant forms of the enzyme with substitutions of these amino acid residues with Ala or Asp to determine their role in the functioning of the ATPase and the distribution of polyphosphates (polyP) by fractions. Growth parameters, ATP content, and in situ polyP distribution were determined on whole cells. To determine the ATPase activity in vitro, plasma membranes containing wild-type enzyme and mutant forms were isolated. Mutants S911D, T912D and S911D/T912A had ATPase activity close to the wild type; mutant S911A had increased activity. The growth rate of strains S911D, T912D and S911D/T912A was 2.0–3.0 times lower than that of the wild type, and the growth rate of S911A was close to the wild type. Mutations S911D and S911D/T912A caused a decrease in ATP content by 2.0–2.5 times. All substitutions affected the distribution of polyP by fractions. The effect depended on the chemical nature of the substitution: in the case of replacement with Asp, which changes the type of phosphosite, there was a decrease in the polyR1 fraction and an increase in the polyR2 fraction; when replaced with Ala, which removes phosphosite, the effect was the opposite. The content of the polyP3 fraction increased in all mutants. The data indicate that the residues of Ser911 and Thr-912 are important not only for the normal functioning of the PMA of H⁺-ATPase, but also for the regulation of phosphorus and energy metabolism.

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