

© Т. Чень¹, Ю. В. Михайлова²,
М. Ф. Шишова¹

¹ ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»;

² Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

Вакуолярная H^+ -АТФаза представляет собой мультисубъединичный белковый комплекс, выполняющий целый ряд ключевых функций в растительной клетке. Известны различные механизмы регуляции активности данного протон-транспортирующего фермента как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровне. В данной работе впервые проведен молекулярно-филогенетический анализ аминокислотных последовательностей субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы для выявления степени консервативности мембранного и периферического комплексов фермента. Показана высокая консервативность субъединиц с, d и В, а также древние дубликации в эволюции субъединицы а.

✿ **Ключевые слова:** H^+ -АТФаза; тонопласт; вакуоль; активность фермента; филогенетический анализ.

МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБЪЕДИНИЦ H^+ -АТФАЗЫ ТОНОПЛАСТА

ВВЕДЕНИЕ

Вакуолярная H^+ -АТФаза (V -АТФаза) растительных клеток представляет собой основной потенциал-генерирующий фермент, локализованный на тонопласте и обеспечивающий движущую силу, заключающуюся в протонном градиенте, для транспорта различных ионов и метаболитов в вакуоль. Накоплен ряд данных, указывающих на универсальность организации и функционирования V -АТФаз у эукариотических клеток (Finbow, Harrison, 1997), а также их сходство с АТФ-синтазами (F -АТФазами) митохондрий и хлоропластов (Ratajczak, 2000). Эти ферментные комплексы используют способ ротационного взаимопревращения энергии макроэргической связи и энергии протонного градиента (Song et al., 2013). Нарушение работы этого фермента зачастую приводит к смерти организма или к появлению серьезных аномалий развития. Однако при всей функциональной значимости работы вакуолярной протонной помпы закономерности ее сборки (соподчинение субъединиц и изменение изоферментного состава), а также способы регуляции ее активности практически не изучены.

Согласно современным представлениям, вакуолярная H^+ -АТФаза состоит из двух доменов: периферического (V_1) и интегрального мембранного (V_0). Домен V_1 осуществляет гидролиз АТФ, а V_0 выполняет функцию транспорта протонов (Beyenbach, Wieczorek, 2006; Martinoia et al., 2007).

Субъединицы домена V_1

Домен V_1 представляет собой структуру «головки на стержне» и включает в себя восемь субъединиц: **А, В, С, D, Е, F, G и Н.**

Молекулярная масса (ММ) субъединицы **А** составляет от 68,5 до 68,8 кДа у разных видов растений. Она содержит нуклеотид-связывающий сайт. При связывании аналогов аденина — 7-хлоро-4-нитробензо-2-оксо-1,3-диазола (Randall, Sze, 1987), флуоресцеин-5'-изотиоцианата (Tzeng et al., 1992) или N-этилмалеимида (Randall, Sze, 1987; Wang, Sze, 1985) с субъединицей **А** происходит ингибирование гидролиза АТФ, что доказывает ее каталитическую функцию.

Молекулярная масса субъединицы **В** — от 53,7 до 54,7 кДа. Субъединица **В** также содержит нуклеотид-связывающий сайт. Однако связывание фотоактивированного АТФ-аналога 3-О-(4-бензоил)бензоиладенозин-5 Р-трифосфата не подавляет гидролиз АТФ (Manolson et al., 1985), что указывает на то, что субъединица **В** является субстрат-связывающей, но не каталитической. Предполагается, что она осуществляет регуляторную функцию.

Остальные субъединицы V_1 -комплекса образуют два стержня разного типа — центральный (**D**- и **F**-субъединицы) и периферический (**С**-, **Е**-, **G**- и **Н**-субъединицы), которые соединяют домены V_1 и V_0 (Cirigiano et al., 2008).

Субъединица **С**, входящая в состав периферического стержня, имеет ММ 37–52 кДа (Ratajczak, 2000). Она играет ключевую роль в обратимой сборке V -АТФазы и в осуществлении сопряжения работы V_1 и V_0 (Hong-Hermesdorf et al., 2006). В структуре субъединицы **С** выделяют три домена — глобулярный «Head», удлиненную «шейку» и глобулярный «foot»-домен. «Head»-домен связывается с комплексом V_1 , а два других — с V_0 . Показано, что субъ-

Поступила в редакцию 03.09.2015
Принята к публикации 31.12.2015

единица **C** вакуолярной H^+ -АТФазы арабидопсиса имеет сайт связывания адениновых нуклеотидов, в результате чего происходят изменения в ее структуре (Armbrüster et al., 2005).

Субъединица **D** с ММ 29,1 кДа входит в состав центрального стержня, соединяющего домен V_0 с головкой домена V_1 , и принимает участие в сопряжении гидролиза АТФ и транспорта протонов (Ratajczak, 2000).

Субъединица **E** входит в состав периферического стержня фермента, который участвует в стабилизации связи V_1 -комплекса с заякоренным в мембране доменом V_0 (Strompen et al., 2005, Dettmer et al., 2010).

Субъединица **F** (ММ 13 кДа) является частью центрального стержня и играет важную роль в сопряжении гидролиза АТФ и транспорта протонов. Предположительно эта субъединица подвергается конформационным изменениям в ходе катализа (Basak et al., 2011).

Субъединица **G** (ММ 12,2 кДа) является частью периферического стержня V_1 , отвечающего за сопряжение процессов гидролиза АТФ и транспорта протонов (Ratajczak, 2000). Полипептид, который представляет собой **G**-субъединицу вакуолярной H^+ -АТФазы *Avena sativa*, остается при домене V_0 после диссоциации V_1 (Ward, Sze, 1992). Это указывает на тесный контакт субъединицы **G** с мембранным интегральным доменом фермента. В составе V -АТФазы субъединица **G** присутствует в форме гомодимера.

Субъединица **H** требуется для связывания домена V_1 с V_0 (периферический стержень), а также для активации V -АТФазы (Kluge et al., 2003).

Субъединицы домена V_0

V_0 -домен V -АТФаз включает в себя до шести субъединиц: **a**, **c**, **c'**, **c''**, **d** и **e** (Gaxiola et al., 2007). Однако у растений в геноме не были обнаружены гены, кодирующие субъединицу **c'**, а в тонопластном протеоме не обнаружены субъединицы **c''** и **e**, что указывает на отсутствие этих субъединиц в составе вакуолярной H^+ -АТФазы (Schumacher, Krebs, 2010). Предполагается, что субъ-

единицы **c''** и **e** принимают участие в сборке и, возможно, в определении локализации фермента (эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи), а не в транспорте протонов (Seidel et al., 2008).

Субъединица **a** трансмембранного домена (ММ 95 кДа) взаимодействует своим цитозольным участком с субъединицей **A** периферического домена и с периферическим стержнем фермента (Padmanaban et al., 2004). Это самая крупная субъединица ферментного комплекса, принимающая участие как в формировании периферического стержня, так и в транспорте протонов (Hanitzsch et al., 2007).

Основным компонентом V_0 -домена тонопластной протонной АТФазы, непосредственно вовлеченным в транспорт протонов, является субъединица **c**. Она представляет собой гидрофобный белок, содержащий четыре трансмембранных домена (Lai et al., 1991). В составе фермента шесть **c**-субъединиц, образующих кольцо, вращение которого ответственно за процесс перемещения протонов (Hirata et al., 2003).

Субъединица **d** — единственная гидрофильная субъединица интегрального домена. Она является частью центрального стержня V -АТФазы и важна для ротационного механизма фермента. Для *Vigna radiata* было продемонстрировано, что комплекс V_0 в отсутствие субъединицы **d** представляет собой пассивный протонный канал (Ouyang et al., 2008).

Гены, кодирующие вакуолярную H^+ -АТФазу, идентифицированы во всех растительных геномах, которые были секвенированы к настоящему времени. Все субъединицы, идентифицированные в геноме дрожжей, кроме субъединицы **c'** обнаружены у растений, причем многие из них кодируются небольшими семействами генов. Суммарное количество генов субъединиц протонной АТФазы тонопласта составляет от 14 у *Chlamydomonas* до 54 у сои. В геноме *Arabidopsis thaliana* обнаружено как минимум 26 генов, кодирующих субъединицы вакуолярной протонной АТФазы (Sze et al., 2002) (табл 1, 2). Кодирование небольшими семействами

Таблица 1

Гены, кодирующие субъединицы домена V_1 (по Sze et al., 2002)

Субъединица, название гена	Количество генов	Количество экзонов	Количество аминокислот в белке
A <i>VHA-A</i>	1	20	623
B <i>VHA-B1</i> <i>VHA-B2</i> <i>VHA-B3</i>	3	12 14 14	486 487 485
C <i>VHA-C</i>	1	11	375
D <i>VHA-D</i>	1	1	261

Таблица 1 (Окончание)

Субъединица, название гена	Количество генов	Количество экзонов	Количество аминокислот в белке
Е	3		
<i>VHA-E1</i>		6	230
<i>VHA-E2</i>		5	235
<i>VHA-E3</i>		6	237
F	1		
<i>VHA-F</i>		4	128
G	3		
<i>VHA-G1</i>		3	110
<i>VHA-G2</i>		3	106
<i>VHA-G3</i>		3	108
H	1		
<i>VHA-H</i>		11	441

Таблица 2

Гены, кодирующие субъединицы домена V₀ (по Sze et al., 2002)

Субъединица, название гена	Количество генов	Количество экзонов	Количество аминокислот в белке
a	3		
<i>VHA-a1</i>		17	780
<i>VHA-a2</i>		18	821
<i>VHA-a3</i>		18	843
c	5		
<i>VHA-c1</i>		3	164
<i>VHA-c2</i>		3	165
<i>VHA-c3</i>		3	164
<i>VHA-c4</i>		3	166
<i>VHA-c5</i>		3	164
c''	2		
<i>VHA-c''1</i>		4	180
<i>VHA-c''2</i>		4	178
d	2		
<i>VHA-d1</i>		10	351
<i>VHA-d2</i>		10	351
e	2		
<i>VHA-e1</i>		3	70
<i>VHA-e2</i>		3	70

позволяет предположить родо- или даже видоспецифичную специализацию изоформ субъединиц V-АТФазы (Schumacher, Krebs, 2010).

Активность вакуолярной Н⁺-АТФазы регулируется многими факторами окружающей среды, поэтому V-АТФазу высших растений называют «эко-ферментом» (Lüttge et al., 2001). Для фермента показана возможность модуляции активности посредством изменения количества ферментных комплексов в составе тонопласта, а также изменения его субъединичного состава. Имеется ряд данных об изменении экспрессии генов, кодирующих субъединицы фермента, и о посттрансляционных модификациях.

Для *Suaeda salsa*, галофита из семейства Chenopodiaceae, было показано, что основной стратегией устойчивости к солевому стрессу у данного вида является увеличение количества ферментных комплексов, а не изменения их структуры (Wang et al., 2001).

При повышении солености и индукции САМ-метаболизма у *Mesembryanthemum crystallinum* наблюдали ряд изменений V-АТФазы: 1) количество и активность фермента повышались (Bremberger, Lüttge, 1992; Ratajczak et al., 1994); 2) соотношение транспорта протонов и гидролиза АТФ уменьшалось (Ratajczak, 2000); 3) увеличивался диаметр V₀-домена (Klink, Lüttge, 1992;

Rockel et al., 1994), что сопровождалось возрастанием количества с-субъединиц и количества их мРНК (Rockel et al., 1998); 4) в стержне появлялись две новые субъединицы, которые являются продуктом модификации субъединицы **B** специфической протеазой или активными формами кислорода (Zhigang et al., 1996; Krisch et al., 2000); 5) V_1 -домен на электронных микрофотографиях представлял собой как гексамерную, так и пентамерную структуру (Kramer et al., 1995), т. е. не всегда число субъединиц **A** и **B** было кратным трем. Представляется интересным то, что при засолении у *Citrus* происходит протеолитическое разрушение субъединицы **A**, а у *M. crystallinum* — субъединицы **B**.

Приведенные выше данные могут служить доказательством многообразия регуляторных механизмов, имеющих у растений, в том числе путем изменения субъединичного состава ферментного комплекса. Наряду с этим, посттрансляционная регуляция может осуществляться и рядом других способов. Так, для H^+ -АТФаз V-типа дрожжей, насекомых и млекопитающих характерен еще один механизм регуляции активности — обратимая диссоциация доменов V_1 и V_0 (Toei et al., 2010). У дрожжей этот процесс происходит при истощении запасов глюкозы в среде, а у насекомых во время линьки для поддержания количества АТФ в клетке. У млекопитающих диссоциация доменов V-АТФазы происходит в клетках почечного эпителия в ответ на изменения уровня глюкозы, однако физиологическое значение этого явления представляется менее понятным. Диссоциация происходит быстро, обратимо и не требует синтеза белков. Активность разделенных периферического и интегрального доменов блокируется. Диссоциированный V_1 -домен не гидролизует АТФ, а свободный V_0 -домен не осуществляет пассивного переноса протонов через мембрану (Jefferies, Forgac, 2008). При добавлении в среду глюкозы происходит сборка фермента. Диссоциация и сборка комплекса V-АТФазы не являются прямым отражением друг друга. Так, для диссоциации требуется участие сети микротрубочек, а для сборки — гетеротримерный белковый комплекс RAVE, стабилизирующий свободный V_1 -комплекс в форме, пригодной для объединения с V_0 . Роль в модуляции стабильности V_1V_0 -комплекса может играть субъединица **C**, выступающая в качестве сенсора глюкозы (Beyenbach, Wiczorek, 2006). В контроле диссоциации V-АТФазы при понижении количества глюкозы в среде принимает участие экстраклеточный уровень рН: при щелочных значениях рН диссоци-

ации не происходит даже при низком уровне глюкозы, так как в этих условиях приоритетным процессом становится поддержание работы H^+ -АТФазы для осуществления закисления вакуоли (Diakov, Kapte, 2010). Сравнительно недавно такой способ регуляции, посредством обратимой диссоциации, был показан и для растений (Schnitzer et al., 2011). Тем самым данный процесс представляется универсальным и наиболее эволюционно древним.

В связи с очень сложными способами организации комплекса и его регуляции, а также в связи с наличием различных изоформ субъединиц, которые могут обладать не только ткане-, но и видоспецифичностью, возникает вопрос: каким образом сформировалось многообразие изоформ и насколько они изменчивы? Существуют ли общие закономерности эволюционных преобразований субъединиц, характерные для V_1 - и V_0 -комплексов? Для ответа на поставленные вопросы в данном исследовании впервые проведен молекулярно-филогенетический анализ аминокислотных последовательностей различных субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск аминокислотных последовательностей субъединиц H^+ -АТФазы тонопласта в базе данных GenBank (GenBank 13.07.2015) проводили с помощью алгоритма blastp (BLAST 10.12.2015; Madden, 2002). Преимущественно были использованы аннотированные последовательности из геномных проектов (известные и смоделированные последовательности белков), а также несколько последовательностей, полученных путем клонирования и секвенирования генов, кодирующих различные субъединицы H^+ -АТФазы тонопласта. Отбирались только полные белковые последовательности, содержащие в своем составе характерные для данного белка домены pfam и мотивы для связывания субстратов. В некоторых случаях последовательности белков проверялись с помощью ресурса по белкам UniProt (The UniProt Consortium, 2015) и ресурса по геномам растений Phytozome 10.3 (Goodstein et al., 2012). Виды выбирались из разных групп цветковых растений (злаков, астерид и розид), чтобы результаты отражали эволюцию субъединиц у цветковых растений. Зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* была использована как внешняя группа при филогенетических построениях. Список проанализированных последовательностей представлен в таблице 3.

Таблица 3

Исследованные аминокислотные последовательности

Субъединицы	Номера последовательностей в GenBank
A	XP_001698410, NP_178011, XP_009104562, XP_009128319, XP_009106605, XP_008462205, XP_004141749, XP_003529464, NP_001242061, KHG19519, XP_007023681, XP_008380395, ABO33173, NP_001234287, NP_001234281, XP_006357450, XP_006362109, XP_009781359, AIS71897, NP_001058280, NP_001046054, ABD85016, EMS67961, XP_008645297, ACG48688, XP_008679916, AFW70345, AFW66324

Таблица 3 (Окончание)

Субъединицы	Номера последовательностей в GenBank
B	XP_001701846, NP_177729, NP_173451, NP_195563, NP_001190954, BAN19957, AAC36485, XP_009106252, XP_009103349, XP_009149511, XP_008447926, XP_008447927, XP_004144861, KGN43272, XP_003552473, XP_003534485, XP_006605856, XP_003536722, KHG25939, KHG14291, XP_012465281, XP_007036766, XP_007036767, XP_007017894, XP_008365054, XP_008365055, XP_008382093, XP_004231058, XP_004248643, XP_006364499, XP_006360894, XP_009783508, AAF26445, NP_001057902, NP_001044043, EAZ37403, EEC71367, EAZ01383, ABN54974, EMS55986, EMS59319, ACSJ06627, NP_001148978, NP_001152665, AFW76484
C	XP_001696429, NP_563916, XP_009148561, XP_009118052, XP_009110617, XP_008463120, XP_004150739, KGN50885, XP_003553974, XP_003518129, XP_006599411, KHG11234, XP_007031994, XP_008379060, XP_004235295, XP_006363973, XP_009786911, NP_001056500, AAO72561, ABG23314, NP_001147632, NP_001142247, XP_008654564, AFW81320, EMS67397
D	EDP01852, NP_191432, CAB46439, XP_009116556, XP_009104169, XP_008449506, XP_004140139, XP_003531738, XP_003530267, KHG05002, XP_007048793, XP_008380248, XP_008353645, XP_010322009, XP_006359140, XP_009786974, XP_009799285, NP_001054048, EAZ32174, AEN95771, EMS57781, NP_001131707, NP_001149703, NP_001151312, XP_008662802, ACF86079
E	XP_001692936, XP_004245546, NP_192853, NP_187468, NP_176602, XP_009772790, XP_006343898
F	EDP07785, NP_192171, XP_009786189, XP_004233261, XP_006364993
G	CAA06756, BAD07544, DAA39513, DAA39514, CAA06757, EMS46087, XP_009773042, XP_003552499, XP_010316755, NP_001275137, XP_009770835, XP_004239677, XP_006345803, NP_186788, XP_009147429, KHG25904, XP_008442676, XP_008387598, NP_194102, XP_009137332, NP_194325, XP_009139721, XP_008444528, XP_004137818, XP_004137819, XP_004137820
H	EDP09300, EMS54494, BAC57732, ACG24799, NP_189791, XP_009138267, XP_008443236, XP_009792608, ELU44195, XP_004242619, KHG22602, XP_004162622, XP_008357072, XP_003548002, XP_006343605
a	XP_001695223, XP_001692167, NP_850122, NP_568051, NP_179736, AAK96647, XP_009140911, XP_009103695, XP_009133874, XP_009109504, XP_009140276, XP_009117405, XP_009149095, XP_008463888, XP_008448072, XP_004149561, XP_004148529, XP_004152666, XP_004168233, XP_004169002, XP_003547511, XP_006594994, XP_003539739, XP_003538035, XP_003527676, XP_003540986, XP_003537855, KHG14971, KHG00921, KHG13921, KHG00114, KHG13283, XP_007015509, XP_007017674, XP_007015511, XP_007017673, XP_007042075, XP_008358210, XP_004251275, XP_004241262, XP_004243162, XP_004230865, XP_006366398, XP_006365749, XP_006356756, XP_006362018, XP_009759132, XP_009769606, XP_009785999, NP_001044718, NP_001049572, EEE50667, EEC71752, EEC66656, CDM85023, AEN95770, XP_008653566, XP_008657093, XP_008660336
c	XP_001696361, NP_195198, NP_564098, NP_195603, NP_177693, NP_001185404, NP_179244, AAA99934, NP_179244, XP_009109515, XP_006416453, XP_009103374, XP_009149488, XP_008444773, XP_004152663, XP_004152664, XP_004133996, XP_003543079, XP_003517187, XP_003520270, XP_006590717, NP_001276180, KHG25128, KHG04199, KHG23863, KHG97295, XP_007017703, XP_008391887, XP_008372768, XP_008387974, XP_008377172, XP_008365697, NP_001233967, XP_004232469, NP_001275382, XP_006340710, XP_009758914, XP_009804090, XP_009770493, Q40585, CAA65063, CAA65062, NP_001054416, NP_001047092, NP_001066258, NP_001065855, NP_001150274, ACN25606, NP_001149195, ABG23316, EMS54266
d	XP_001703440, AF324679, NP_001189996, NP_189512, NP_189513, XP_009151855, XP_009129362, XP_009111605, XP_008443426, XP_004147464, KGN59587, XP_004166299, NP_001242797, XP_003534461, KHG24135, KHG10145, XP_007032459, XP_008341542, XP_010312197, XP_006339198, XP_009765131, XP_009790018, XP_009790017, NP_001043429, BAV89911, ABG23315, CDM83070, EMS47297, ACR36866

Аминокислотные последовательности выравнивались с помощью алгоритма MUSCLE на сайте Европейского института биоинформатики (EMBL-EBI 10.12.2015), после чего выравнивания проверялись «вручную». Для анализа последовательностей, подбора оптимальных эволюционных моделей по критериям BIC (информационный критерий Байеса) и AIC (информационный критерий Акаике), построения дерева методом объединения сосе-

дей (NJ) использовали программу MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Филогенетические деревья методами объединения соседей строили на основе аминокислотных p-расстояний и эволюционных расстояний JTT (Jones et al., 1992). Для пропущенных данных и делеций была выбрана опция partial deletion coverage cutoff 95 %. В качестве показателя устойчивости дерева использовали бутстреп-индексы, рассчитанные на основе 500 повторностей. Филогенети-

ческие деревья методами максимального правдоподобия (ML) строили с использованием оптимальной эволюционной модели согласно критерию BIC. Метод максимального правдоподобия был реализован в пакете PhyML (Guindon, Gascuel, 2003) через графический интерфейс программы Unipro UGENE 1.19 (Okonechnikov et al., 2012). Для статистической оценки ветвей деревьев, построенных методом максимального правдоподобия, использовали непараметрический тест SH-aLRT (Anisimova, Gascuel, 2008). Байесовский анализ проводили с помощью программы MrBayes 3.1 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Оптимальную эволюционную модель определяли по вкладу модели в распределение апостериорной вероятности. Для каждой субъединицы в программе запускали два независимых анализа MCMC со следующими условиями: 500 000 генераций, 50 000 отбрасываемых начальных генераций (burn-in), 4 цепи (одна холодная и три горячих), гамма-распределение с четырьмя категориями (G). Трассировочные файлы, сгенерированные в ходе MCMC, анализировались с помощью программы Tracer 1.16 (Rambaut et al., 2014). Для статистической оценки ветвей деревьев, построенных методом Байеса, использовали оценку апостериорной вероятности. Для графической работы с филогенетическими деревьями использовали программу FigTree v. 1.4.2 (FigTree 10.12.2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты. Характеристика выравнивания аминокислотных последовательностей

Для реконструкции филогении субъединиц белкового комплекса H⁺-АТФазы тонопласта нами были выбраны

восемнадцать видов из разных групп цветковых растений. Эти виды представляли два класса цветковых: двудольные и однодольные. Из двудольных были выбраны представители нескольких семейств из групп астерид и розид. В настоящее время филогенетические отношения между этими группами хорошо известны (Angiosperm Phylogeny Website 10.12.2015), и мы можем сопоставить с ними построенные в нашей работе филогенетические деревья белковых субъединиц. Некоторые субъединицы были проанализированы по меньшему числу видов, так как несколько последовательностей были отбракованы из-за ненадлежащего качества.

У большинства видов было обнаружено несколько изоформ каждой из субъединиц. Число изоформ варьирует в зависимости от вида и от конкретной белковой субъединицы. Больше всего изоформ отмечается для субъединицы а трансмембранного комплекса V₀. У этой же субъединицы мы обнаружили самое большое число полиморфных сайтов: 63,2 %, из которых 90 % парсимонично информативны. Также высокое число полиморфных сайтов наблюдается у субъединиц **C** и **D** периферического домена V₁, самое низкое число — у субъединицы с интегрального домена (табл. 4). Таким образом, мы можем разделить исследованные субъединицы на две группы: с высоким уровнем полиморфизма (**C**, **D**, **a**) и низким (**A**, **B**, **c**, **d**). Похожую картину можно наблюдать по межаминокислотным р-расстояниям: наибольшие значения у **a** и **D**, самые маленькие у **B** и **c**.

Результаты подбора эволюционных моделей представлены в таблице 4. В число оптимальных вошло три семейства моделей: Le-Gascuel (LG), Jones-Taylor-Thornton (JTT) и General Reversible Chloroplast (cpREV).

Таблица 4

Характеристики аминокислотных последовательностей субъединиц вакуолярной H⁺-АТФазы

Субъединица	Число видов	Число последовательностей	Число аминокислот в выравнивании			Максимальные р-расстояния*	Оптимальная эволюционная модель			Средняя длина дерева при анализе методом Байеса***	Средняя длина ветвей при анализе методом Байеса***
			всего	полиморфных*	парсимонично информативных*		согласно AIC	согласно BIC	согласно доле апостериорной вероятности**		
V1-A	16	28	627	122 (19,5 %)	99 (15,7 %)	12,1 %	LG+G+I	LG+G	WAG/JTT	1,4223	0,0268
V1-B	17	42	506	67 (13,2 %)	50 (9,9 %)	6,5 %	JTT+G+I	JTT+G+I	JTT	3,9931	0,0493
V1-C	13	22	388	175 (45,1 %)	140 (36 %)	27,0 %	JTT+G	JTT+G	JTT	2,565	0,0626
V1-D	15	24	271	138 (50,9 %)	127 (46,9 %)	38,4 %	LG+G	LG+G	JTT	3,0454	0,0677
V0-a	15	56	886	560 (63,2 %)	508 (57,3 %)	39,5 %	JTT+G+I+F	JTT+G+I	JTT	6,6035	0,0606
V0-c	18	37	178	26 (14,6 %)	12 (6,7 %)	5,0 %	cpREV+G	cpREV	cpREV	0,7976	0,0112
V0-d	15	29	352	81 (23 %)	59 (16,8 %)	12,1 %	LG+G	LG+G	JTT	1,0075	0,0183

* — число полиморфных и парсимонично информативных сайтов и р-расстояния указаны без учета внешней группы, т. е. только для высших растений; ** — при оценке доли апостериорной вероятности оценивались только сами модели без учета параметров G и I, которые должны быть предустановлены при анализе в MrBayes; *** — длины деревьев и ветвей оценивали исходя из ожидаемого числа нуклеотидных замен на сайт. LG — модель Le-Gascuel, JTT — модель Jones–Taylor–Thornton, cpREV — модель General Reversible Chloroplast; параметры моделей: G — гамма-распределение, I — инвариантные сайты, F — аминокислотные частоты, рассчитываемые по выравниванию

Для трех субъединиц (**B**, **C**, **a**) была выбрана модель JTT. Эта модель была предложена в 1992 г. на основе усовершенствованной матрицы аминокислотных замен (Jones et al., 1992) вместо матрицы PAM (Dayhoff et al., 1978). Модель LG была выбрана для субъединиц **A**, **D** и **d**. Так как эта модель не включена в программу MrBayes, то по апостериорной вероятности вместо нее для указанных субъединиц оптимальными были модели JTT и WAG. По критериям AIC и BIC для этих субъединиц следующей по оптимальности моделью после LG была JTT. Более современные модели используют матрицы аминокислотных замен, рассчитанные по большему числу накопленных данных, и чаще всего последние модели лучше подходят для реконструкции филогении, но есть и исключения (Le, Gascuel, 2008). Довольно неожиданным результатом стал выбор оптимальной модели *srREV* для протеолипидной субъединицы **c**. Модель *srREV* разработана для белков, закодированных хлоропластными генами водорослей и высших растений (Adachi et al., 2000). Существуют предположения, что субъединица **c** АТФаз V-типа возникла в результате слияния двух протеолипидных субъединиц АТФаз F-типа (Nelson, 1992; Kibak et al., 1992), которые локализованы на мембранах хлоропластов и митохондрий и участвуют в синтезе АТФ в ходе процессов фотосинтеза и дыхания. Выбор модели *srREV* является дополнительным аргументом в пользу родства протеолипидных субъединиц АТФаз вакуолей и хлоропластов.

Филогения субъединиц периферического комплекса V_1

Для построения филогенетических деревьев были использованы три метода: NJ, ML и метод Байеса. На рисунке 1 представлены филогенетические деревья субъединицы **A**, построенные различными методами. Можно видеть, что топологии всех трех моделей в достаточной степени схожи. Больше всего узлов с поддержкой более 50 % наблюдалось при построении деревьев методом ML, поэтому на остальных рисунках представлены реконструкции, проведенные именно им. Филогенетическое дерево субъединицы **A** сходно с филогенией растений, что характерно для последовательностей ортологов. Для нескольких видов были выделены изоформы субъединицы **A**: три изоформы у *Brassica rapa*, по две у *Glycine max*, *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*. В случае *S. tuberosum* и *S. lycopersicum* две изоформы (**A1** и **A2**) оказались паралогами. Дупликация исходного гена, которая привела к их образованию, по-видимому, произошла еще у общего предка томата и картофеля. Такая же картина наблюдается для изоформ риса *O. sativa*.

Филогенетическое дерево некаталитической АТФ-связывающей субъединицы **B** в меньшей степени согласуется с филогенией растений, представители только некоторых семейств образуют монофилетичные

клады (рис. 2 Б). Изоформы были обнаружены для всех видов кроме *Cucumis melo*, *C. sativus*, *Nicotiana sylvestris*, *N. tabacum*, *Triticum aestivum* и *T. urartu*. В большинстве случаев изоформы одного вида попадали в разные клады, что говорит о том, что они являются паралогами.

Топология филогенетического дерева субъединиц **C** (рис. 2 А) и **D** (рис. 2 В) была близка с таковой для **A**. У обеих субъединиц изоформы являлись ортологами. Изоформы субъединицы **C** были обнаружены только у четырех видов: *G. max*, *B. rapa*, *O. sativa* и *Z. mays*. Изоформы субъединицы **D** найдены у *Malus domestica*, *G. max*, *N. sylvestris*, *B. rapa*, *A. thaliana*, *Z. mays* и *O. sativa*. Все изоформы одного вида образовывали монофилетичные группы, что позволяет предположить их относительно недавнее происхождение.

Сходные по топологии филогенетические деревья были получены для субъединиц **G** и **H**, по 26 и 15 аминокислотным последовательностям, соответственно. У субъединицы **G** были обнаружены изоформы почти во всех изученных видах. Изоформы одного вида являлись паралогами и попадали в разные клады. Филогенетические деревья субъединиц **G-H** не представлены, т.к. они были сходны по топологии с деревом субъединицы **A**.

Филогения субъединиц мембранного комплекса V_0

На молекулярно-филогенетическом дереве субъединицы **a** аминокислотные последовательности формировали две клады с высокой поддержкой при любом методе анализа (реконструкция методом ML представлена на рис. 3). У всех видов присутствовало не менее двух изоформ этого белка. В первой клade содержались изоформы, обозначенные как **a1**, во второй — **a2** и **a3**. Разделение на однодольные и двудольные происходило уже внутри клад **a1** и **a2/a3**. У некоторых видов было несколько изоформ в группе **a1** (*B. rapa*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, *G. arboretum*, *G. max*). В клade **a2/a3** двудольные распадались на две подклады. Филогенетическое дерево последовательностей субъединицы **a** свидетельствует о древней дупликации кодирующих ее генов. Первая древняя дупликация произошла у предков цветковых растений или еще раньше, у предков наземных растений. Таким образом сформировались изоформа **a1** и общая предковая изоформа для **a2** и **a3**. Вторая дупликация привела к образованию изоформ **a2** и **a3** и происходила уже после разделения двудольных и однодольных.

На филогенетическом дереве протеолипидной субъединицы **c** было меньше клад с высокой статистической поддержкой (рис. 4 А). Это связано с низким числом вариативных сайтов при выравнивании (табл. 4), среди которых высока доля парсимонично неинформативных замен. Также для этой субъединицы отмечено самое низ-

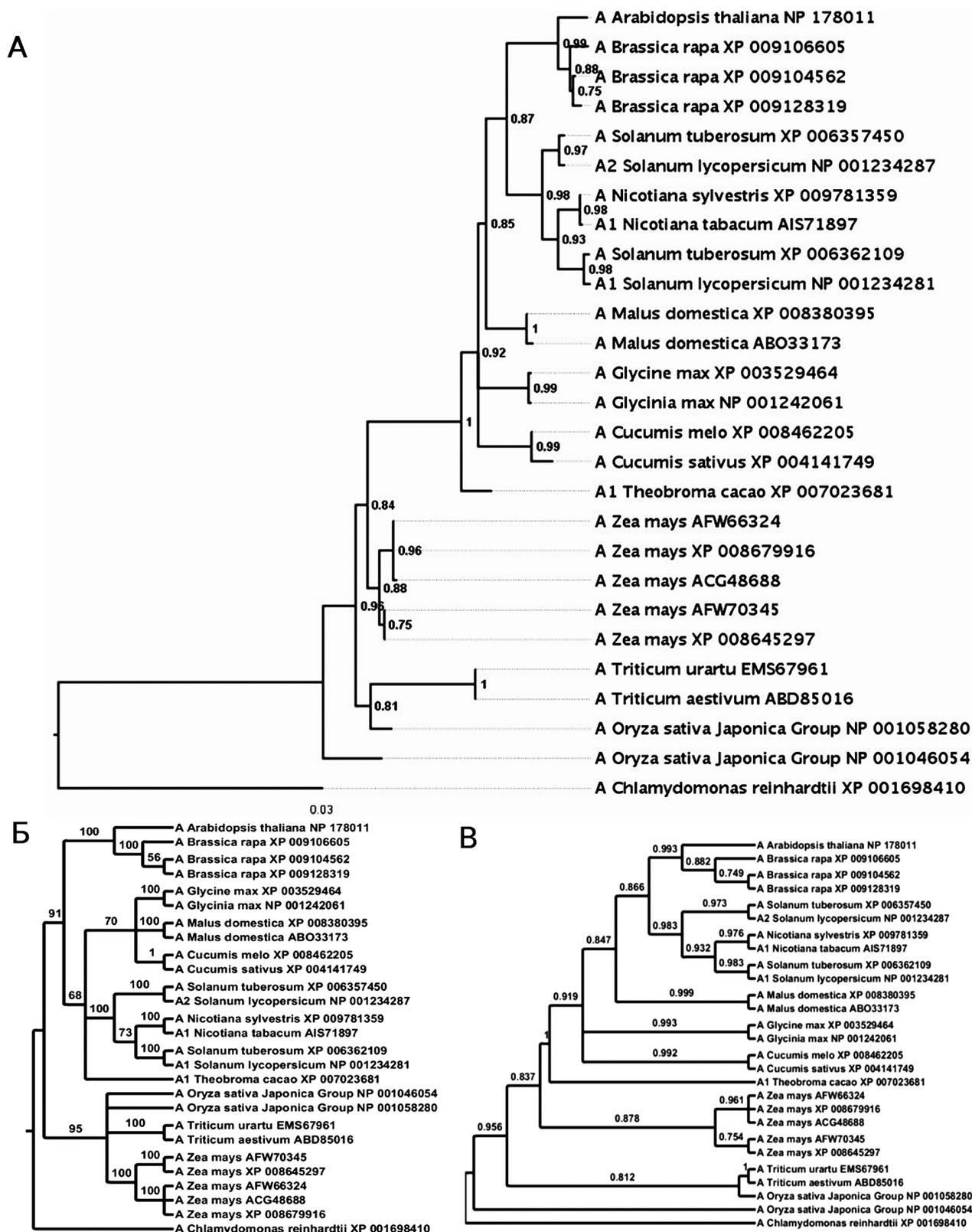


Рис. 1. Филогенетические деревья аминокислотных последовательностей субъединицы А периферического комплекса V₁; А — филогенетическое дерево, построенное методом ML с использованием модели LG + G, указаны значения SH-aLRT более 0,5, масштабная линейка — число ожидаемых аминокислотных замен на сайт; Б — кладограмма, построенная методом NJ с использованием модели JTT + G, указаны значения бутстреп-индексов более 50%; В — кладограмма, построенная методом Байеса с использованием моделей WAG/JTT + G, указаны значения апостериорной вероятности более 0,5

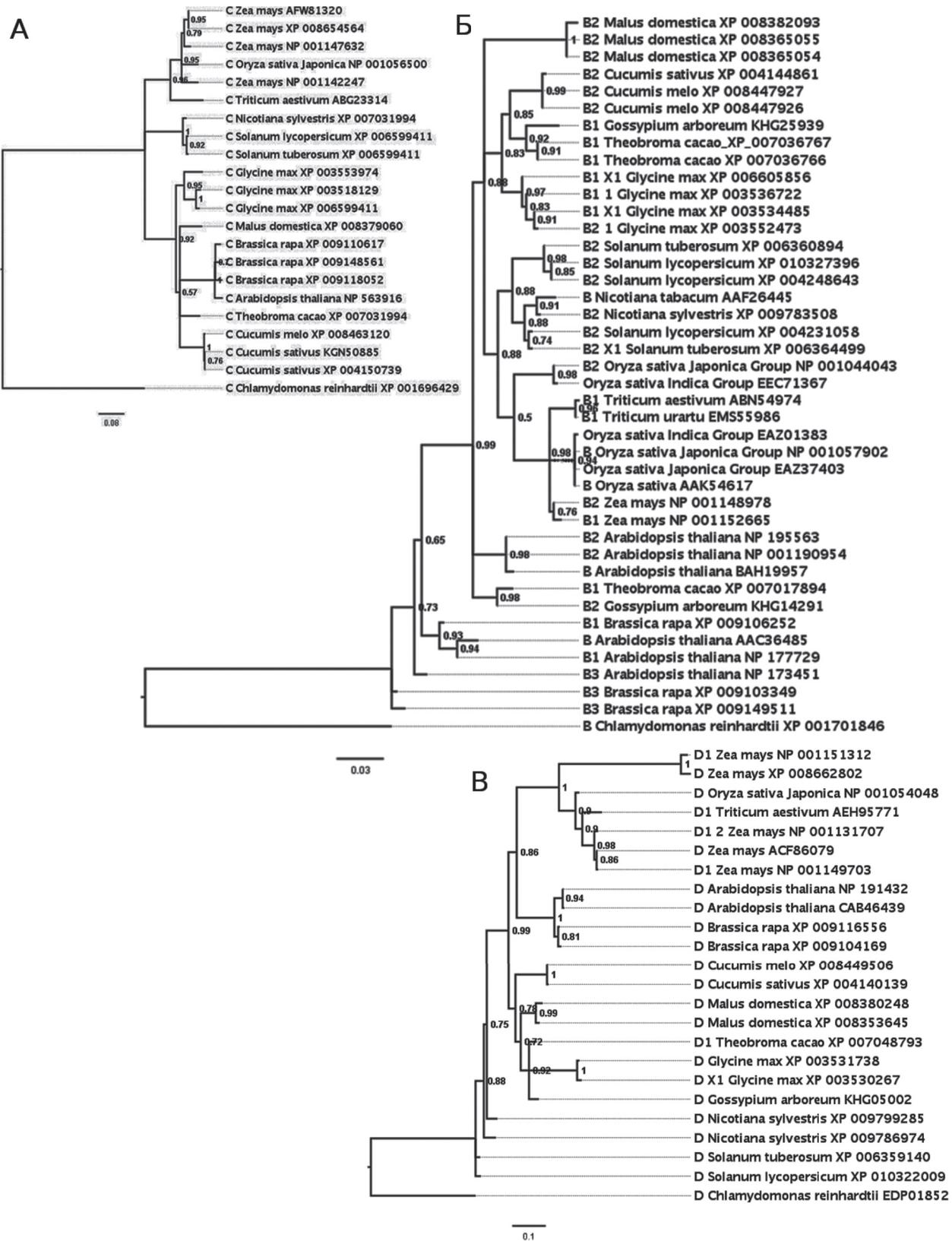


Рис. 2. Филогенетические деревья аминокислотных последовательностей субъединиц **C** (A), **B** (Б) и **D** (В) периферического комплекса V_1 , построенные методом ML; указаны значения SH-aLRT более 0,5; масштабная линейка — число ожидаемых аминокислотных замен на сайт

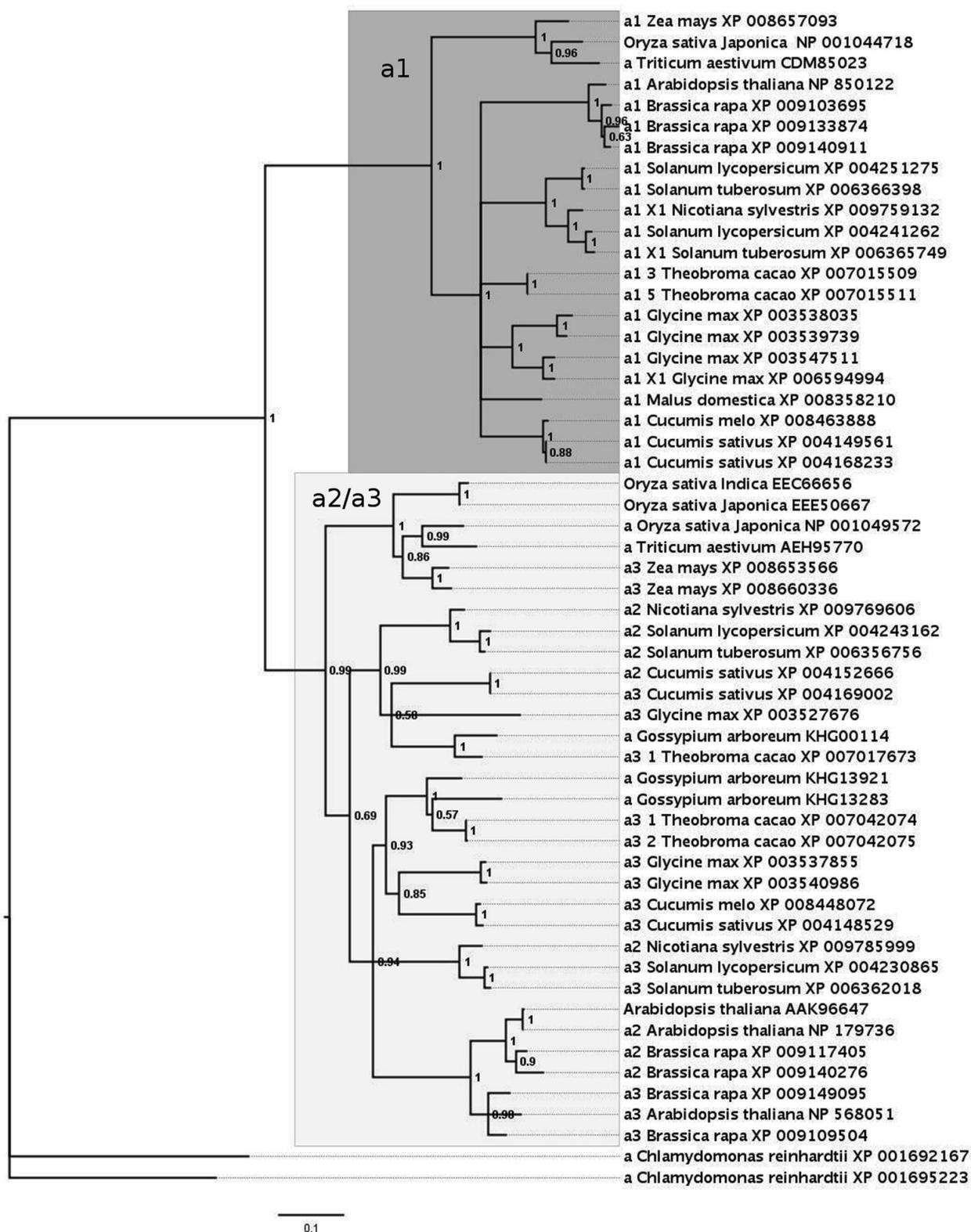


Рис. 3. Филогендрограма аминокислотных последовательностей субъединицы a трансмембранного комплекса V₀, построенная методом ML; указаны значения SH-aLRT более 0,5; масштабная линейка — число ожидаемых аминокислотных замен на сайт. Серыми блоками обозначены клады a1 и a2/a3

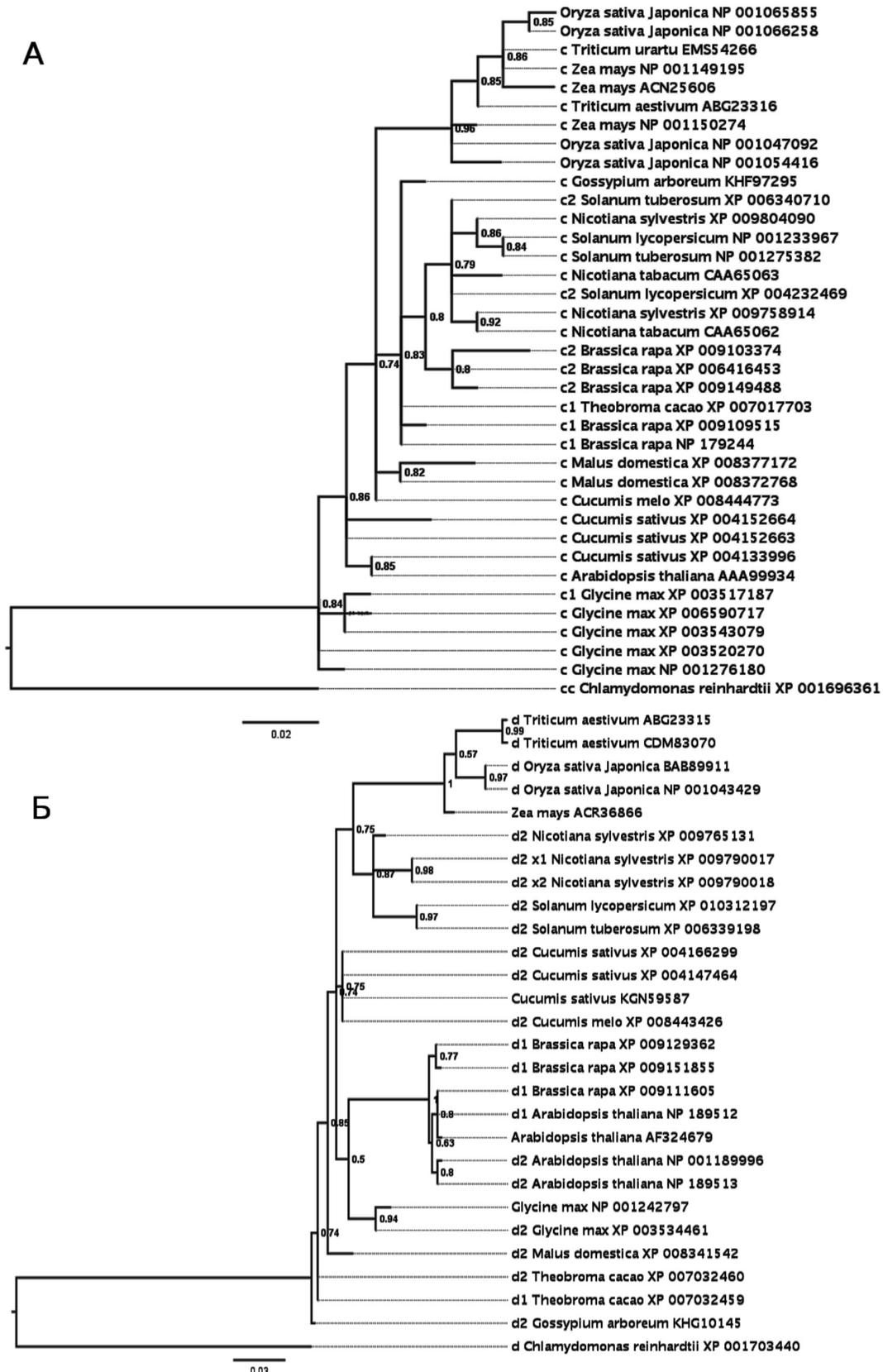


Рис. 4. Филогенетические деревья аминокислотных последовательностей субъединиц с (А) и d (Б) трансмембранного комплекса V_0 , построенные методом ML; указаны значения SH-aLRT более 0,5; масштабная линейка — число ожидаемых аминокислотных замен на сайт

кое значение средней длины филогенетического дерева (табл. 4). Несмотря на низкую вариабельность, у многих видов существуют изоформы, отличающиеся между собой одной или несколькими аминокислотами. У *Zea*, *Solanum* и *Nicotiana* изоформы являются паралогами, возникшими в результате недавней дубликации. Для остальных видов из-за низкой поддержки клад филогенетического дерева нельзя определенно сказать, являются ли изоформы паралогами или ортологами.

Филогенетическое дерево третьего белка трансмембранного комплекса, субъединицы **d**, было похоже на деревья субъединиц периферического комплекса **D** (рис. 4 Б). Изоформы были идентифицированы у *N. sylvestris*, *G. max*, *A. thaliana*, *B. rapa*, *C. sativus*, *T. cacao*, *T. aestivum*, *O. sativa*. Как и для **a**, для этой субъединицы отмечено довольно низкое значение средней длины филогенетического дерева (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Интерес к эволюции вакуолярной АТФазы возник еще в начале 90-х гг., однако большинство исследований было посвящено ее происхождению от F-АТФаз митохондрий и хлоропластов, по-видимому, из-за общего принципа субъединичного строения фермента (Gogarten et al., 1992). Особенности эволюции данного фермента внутри царства растений уделялось мало внимания. Возможно, это объяснялось еще и недостатком информации, так как клонировать и секвенировать такой мультиферментный комплекс — это трудоемкая и затратная по времени задача. В настоящее время благодаря интенсивному развитию технологий секвенирования нового поколения и реализации геномных проектов появилась возможность сравнения десятков последовательностей, что позволило говорить о молекулярной эволюции каждой из субъединиц. Необходимые данные представлены в широкодоступных базах данных. Именно они были использованы нами для данного исследования характера изменчивости различных субъединиц фермента.

Нами показано, что различные субъединицы V-АТФазы изменяются в ходе эволюции по-разному, хотя и являются структурными частями одного белка. На основе проведенного анализа можно охарактеризовать несколько основных особенностей эволюции, которые по-разному сочетаются у разных субъединиц этого фермента.

1. Древние дубликации. Филогенетический анализ субъединицы **a** показывает как минимум два события дубликации ее генов. Согласно современным представлениям древние цветковые отделились примерно 374 миллионов лет назад (Silvestro et al., 2015). Результаты молекулярно-филогенетического анализа субъединицы **a** позволяют предположить, что дубликация кодирующего ее гена произошла до этого события. Возможно, дубликация этого белка связана

с переходом растений к наземному существованию. Вторая дубликация произошла у двудольных, после отделения однодольных, не позднее 100 млн лет назад (примерное время дивергенции — Poales, Hertweck et al., 2015). Предположение о древней дубликации, произошедшей около 300 млн лет назад, ранее было сделано для субъединицы **A** периферического комплекса на основе сравнения длины уникального для растений интрона (Gogarten et al., 1992; Starke, Gogarten, 1993). Наши данные не подтверждают этого для **A** домена V_1 , но достоверно показывают для **a** домена V_0 .

2. Новые дубликации. В большинстве случаев новые дубликации субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы происходили либо при становлении отдельных семейств цветковых (такая картина наблюдается у *Solanaceae*), либо позже, при дивергенции таксонов внутри семейства (например, *O. sativa* из *Poaceae*). Изоформы, возникшие в результате новых дубликаций, могут различаться тканеспецифичностью экспрессии и участием в адаптации к стрессовым воздействиям (Bageshwar et al., 2005).
3. Высокая консервативность. Проведенный анализ свидетельствует, что аминокислотные последовательности субъединицы **c** очень близки у всех цветковых растений. Об этом говорит и низкое число вариабельных сайтов выравнивания, и наименьшая длина филогенетического дерева, и выбор в качестве оптимальной эволюционной модели, разработанной для хлоропластных белков. Консервативность субъединицы **c** можно объяснить ее функциональностью как трансмембранного канала. В то же время клонировано несколько изоформ этой субъединицы, по-разному отвечающих на солевой стресс (Lehr et al., 1999). Изоформы, рассмотренные нами, отличались между собой всего несколькими аминокислотами. По-видимому, даже такие минимальные различия в столь консервативном белке могут приводить к существенному изменению работы фермента. Консервативностью отличалась и другая субъединица интегрального домена — **d**, что может быть связано с ее ролью в ротационном механизме V-АТФазы. Также относительно консервативной оказалась субъединица **B**, что может быть связано с выполнением регуляторной функции. Хотя она не участвует в гидролизе АТФ, но содержит АТФ-связывающие сайты, которые модулируют активность фермента, а при определенных мутациях в центрах связывания АТФ на субъединице **B** происходит полное выключение работы фермента или разобщение транспортной и каталитической составляющих активности (Liu et al., 1996; Vasilyeva et al., 2000). Кроме того, показано, что именно субъединица **B** может быть фосфорилирована по серину (Martiny-Baron et al., 1992), что является одним из механизмов посттрансляционной регуляции фермента.

Таким образом, эволюция H^+ -АТФазы тонопласта представляет собой сложный процесс. Субъединицы периферического комплекса V_1 характеризовались высокой вариабельностью, за исключением субъединицы **В**, которая отличалась консервативностью. Наиболее консервативной была субъединица V_0-c , формирующая протонный канал. В то же время субъединица **а** дублировалась несколько раз, что привело к появлению большого разнообразия изоформ. Благодаря сочетанию древних и новых дубликаций, консервативности и изменчивости отдельных субъединиц могло происходить появление V -АТФаз с новыми свойствами, необходимыми для приспособления к меняющимся условиям окружающей среды. Таким образом, филогенетическое сравнение субъединиц демонстрирует возникновение баланса между изоформами, который позволяет растениям гибко адаптироваться к условиям окружающей среды и смене морфогенетических программ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-00945); а также государственного задания БИН РАН № 0126-2014-0028.

ЛИТЕРАТУРА

- Adachi J., Waddell P.J., Martin W., Hasegawa M. (2000) Plastid genome phylogeny and a model of amino acid substitution for proteins encoded by chloroplast DNA. *J. Mol. Evol.* V. 50: P. 348–358.
- Angiosperm Phylogeny Website, version 13. Cited 10.12.2015. URL: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Anisimova M., Gascuel O. (2006) Approximate likelihood ratio test for branches: A fast, accurate and powerful alternative. *Systematic Biology*. V. 55 (4): P. 539–552.
- Armbrüster A., Hohn C., Hermesdorf A. et al. (2005) Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding. *FEBS Letters*. V. 579: P. 1961–1967.
- Bageshwar U.K., Taneja-Bageshwar S., Moharram H.M., Binzel M.L. (2005) Two isoforms of the A subunit of the vacuolar H^+ -ATPase in *Lycopersicon esculentum*: highly similar proteins but divergent patterns of tissue localization. *Planta*. V. 220: P. 632–643.
- Basak S., Gayen S., Thaker Y.R. et al. (2011) Solution structure of subunit F (Vma7p) of the eukaryotic V_1V_0 ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* derived from SAXS and NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1808: P. 360–368.
- Beyenbach K.W., Wiczorek H. (2006) The V-type H^+ -ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* V. 209: P. 577–589.
- BLAST. Cited 10.12.2015. URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Bremberger C., Lüttge U. (1992) Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of Crassulacean acid metabolism. *Planta*. V. 188(4). P. 575–580.
- Cipriano D.J., Wang Y., Bond S. et al. (2008) Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1777: P. 599–604.
- Dayhoff M.O., Schwarz R.M., Orcut B.C. (1978) A model of Evolutionary change in proteins In Dayhoff M.O., editor. Atlas of protein sequences. 5. National Biomedical Research Foundation; p. 345–352.
- Dettmer J., Liu T.Y., Schumacher K. (2010) Functional analysis of Arabidopsis V-ATPase subunit VHA-E isoforms. *Eur. J. Cell Biol.* V. 89: P. 152–156.
- Diakov T.T., Kane P.M. (2010) Regulation of vacuolar proton-translocating ATPase activity and assembly by extracellular pH. *J. Biol. Chem.* V. 285: P. 23771–23778.
- EMBL EBI MUSCLE. Cited 10.12.2015. URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>.
- FigTree. Cited 10.12.2015. URL: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Finbow M.E., Harrison M.A. (1997) The vacuolar H^+ -ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem. J.* V. 324: P. 697–712.
- Gaxiola R.A., Palmgren M.G., Schumacher K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Letters*. V. 581: P. 2204–2214.
- Gene Bank. Cited 13.07.2015. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Gogarten J.P., Starke T., Kibak H. et al. (1992) Evolution and isoforms of V-ATPase Subunits. *J. Exp. Biol.* V. 172: P. 137–147.
- Goodstein D.M., Shu S., Howson R. et al. (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* V. 40 (D1): D1178–D1186.
- Guindon S., Gascuel O. (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. V. 52 (5): P. 696–704.
- Hanitzsch M., Schnitzer D., Seidel T. et al. (2007) Transcript level regulation of the vacuolar H^+ -ATPase subunit isoforms VHA-a, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Membrane Biology*. V. 24: P. 507–518.
- Hertweck K.L., Kinney M.S., Stuart S.A. et al. (2015) Phylogenetics, divergence times and diversification from three genomic partitions in monocots. *Botanical Journal of the Linnean Society*. V. 178: P. 375–393.
- Hirata T., Iwamoto-Kihara A., Sun-Wada G.H. et al. (2003) Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G and C subunits. *J. Biol. Chem.* V. 278: P. 23714–23719.
- Hong-Hermesdorf A., Brück A., Grüber A. et al. (2006) A WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C. *FEBS Letters*. V. 580: P. 932–939.

26. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. V. 17: P. 754–755.
27. Jefferies K. C., Forgac M. (2008) Subunit H of the Vacuolar H⁺-ATPase Inhibits ATP Hydrolysis by the Free V1 Domain by Interaction with the Rotary Subunit F. *J. Biol. Chem.* V. 283: P. 4512–4519.
28. Jones D. T., Taylor W. R., Thornton J. M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*. V. 8: P. 275–282.
29. Kibak H., Taiz L., Starke T. et al. (1992) Evolution of Structure and Function of V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 24 (4): P. 415–424.
30. Klink R., Lüttge U. (1992) Quantification of visible structural changes of the V0V1-ATPase in the leaf tonoplast of *Mesembryanthemum crystallinum* by freeze-fracture replicas prepared during the C3-photosynthesis to CAM transition. *Bot. Acta.* V. 105: P. 414–420.
31. Kluge C., Lahr J., Hanitzsch M. et al. (2003) New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H⁺-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 35: P. 377–388.
32. Kramer D., Mangold B., Hille A. et al. (1995) The head of a higher plant V-type H⁺-ATPase is not always a hexamer but also a pentamer. *J. Exp. Bot.* V. 46: P. 1633–1636.
33. Krisch R., Rakowski K., Ratajczak R. (2000) Processing of V-ATPase subunit B of *Mesembryanthemum crystallinum* L. is mediated *in vitro* by a protease and/or active oxygen species. *Biol. Chem.* V. 381: P. 583–592.
34. Lai S. P., Watson J. C., Hansen J. N., Sze H. (1991) Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the proteolipid subunit of the vacuolar H⁺-ATPase from a higher plant. *J. Biol. Chem.* V. 266: P. 16078–16084.
35. Le S. Q., Gascuel O. (2008) LG: An Improved, General Amino-Acid Replacement Matrix *Mol. Biol. Evol.* V. 25(7): P. 1307–1320.
36. Lehr A., Kirsch M., Viereck R. et al. (1999) cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H⁺-ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity. *Plant Mol. Biol.* V. 39: P. 463–475.
37. Liu Q., Kane P. M., Newman P. R., Forgac M. (1996) Site-directed mutagenesis of the yeast V-ATPase B subunit (Vma2p). *J. Biol. Chem.* V. 271: P. 2018–22.
38. Lüttge U., Fischer-Schliebs E., Ratajczak R. (2001) The H⁺-pumping V-ATPase of higher plants: a versatile eco-enzyme in response to environmental stress. *Cell Biol. Mol. Lett.* V. 6: P. 356–361.
39. Madden T. (2000) The BLAST Sequence Analysis Tool. In: J. McEntyre, J. Ostell, editors. *The NCBI Handbook*. Bethesda (MD). National Center for Biotechnology Information. Cited 10.12.2015. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>.
40. Manolson M. F., Rea P. A., Poole R. J. (1985) Identification of 3-O-(4-benzoyl)benzoyladenine 5'-triphosphate- and N, N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding subunits of a higher plant H⁺-translocating tonoplast ATPase. *J. Biol. Chem.* V. 260: P. 12273–12279.
41. Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H. E. (2007) Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J. Exp. Bot.* V. 58: P. 83–102.
42. Martiny-Baron G., Manolson M. F., Poole R. J. et al. (1992) Proton transport and phosphorylation of tonoplast polypeptides from zucchini are stimulated by the phospholipid platelet-activating factor. *Plant Physiol.* V. 99: P. 1635–1641.
43. Nelson N. (1992) Structural conservation and functional diversity of V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 24(4): P. 407–414.
44. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. V. 28: P. 1166–1167.
45. Ouyang Z., Li Z., Zhang X. (2008) Cloning and sequencing of V-ATPase subunit d from mung bean and its function in passive proton transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 40: P. 569–576.
46. Padmanaban S., Lin X., Perera I. et al. (2004) Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiol.* V. 134: P. 1514–1526.
47. Rambaut A., Suchard M. A., Xie D., Drummond A. J. (2014) Tracer v1.6. Cited 10.12.2015. URL: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
48. Randall S. K., Sze H. (1987) Probing the catalytic subunit of the tonoplast H⁺-ATPase from oat roots. Binding of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3, — diazole to the 72-kilodalton polypeptide. *J. Biol. Chem.* V. 262: P. 7135–7141.
49. Ratajczak R. (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta.* V. 1465: P. 17–36.
50. Ratajczak R., Richter J., Lüttge U. (1994) Adaptation of the tonoplast V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* to salt stress, C3-CAM transition and plant age. *Plant Cell Environm.* V. 17: P. 1101–1112.
51. Rockel B., Lüttge U., Ratajczak R. (1998) Changes of message amount of V-ATPase subunits during salt-stress induced C3-CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.* V. 36: P. 567–573.
52. Rockel B., Ratajczak R., Becker A., Lüttge U. (1994) Changed densities and diameters of intra-membrane tonoplast particles of *Mesembryanthemum crystallinum* in correlation with NaCl-induced CAM. *J. Plant Physiol.* V. 143: P. 318–324.
53. Schnitzer D., Seidel T., Sander T. et al. (2011) The cellular energization state affects peripheral stalk stability of plant vacuolar H⁺-ATPase and impairs vacuolar acidification. *Plant Cell Physiol.* V. 52: P. 946–956.

54. Schumacher K., Krebs M. (2010) The V-ATPase: small cargo, large effects. *Current Opinion in Plant Biology*. V. 13: P. 724–730.
55. Seidel T., Schnitzer D., Gollmack D. et al. (2008) Organelle-specific isoenzymes of plant V-ATPase as revealed by *in vivo*-FRET analysis. *BMC Cell Biology*. V. 9: P. 28.
56. Silvestro D., Cascales-Miñana B., Bacon C. D., Antonelli A. (2015) Revisiting the origin and diversification of vascular plants through a comprehensive Bayesian analysis of the fossil record. *New Phytologist*. V. 207: P. 425–436.
57. Song C. F., Papachristos K., Rawson S. et al. (2013) Flexibility within the rotor and stators of the vacuolar H⁺-ATPase. *PLoS One*. V. 8: e82207.
58. Starke T., Gogarten J. P. (1993) A conserved intron in the V-ATPase A subunit genes of plants and algae. *FEBS Letters*. V. 3: P. 252–258.
59. Strompen G., Dettmer J., Stierhof Y. D. et al. (2005) *Arabidopsis* vacuolar H⁺-ATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis. *Plant J*. V. 41: P. 125–132.
60. Sze H., Schumacher K., Müller M. L. et al. (2002) A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Trends Plant Sci*. V. 7 (4): P. 157–161.
61. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* V. 30: P. 2725–2729.
62. The UniProt Consortium. (2015) UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* V. 43: D204–D212.
63. Toei M., Saum R., Forgacs M. (2010) Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry*. V. 49: P. 4715–4723.
64. Tzeng C. M., Hsu L. H., Pan R. L. (1992) Inhibition of tonoplast ATPase from etiolated mung bean seedlings by fluorescein 5'-isothiocyanate. *Biochem J*. V. 285 (3): P. 737–743.
65. Vasilyeva E., Liu Q., MacLeod K. J. et al. (2000) Cysteine scanning mutagenesis of the noncatalytic nucleotide binding site of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* V. 275: P. 255–260.
66. Wang B., Lüttge U., Ratajczak R. (2001) Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *J. Exp. Bot.* V. 52 (365): P. 2355–2365.
67. Wang Y., Sze H. (1985) Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H⁺-ATPases of oat roots. *J. Biol. Chem.* V. 260 (19): P. 10434–10443.
68. Ward J. M., Sze H. (1992) Subunit Composition and Organization of the Vacuolar H⁺-ATPase from Oat Roots. *Plant Physiol*. V. 99 (1): P. 170–179.
69. Zhigang A., Löw R., Rausch T. et al. (1996) The 32 kDa tonoplast polypeptide Di associated with the V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* L. in the CAM state: A proteolytically processed subunit B? *FEBS Letters*. V. 389: P. 314–318.

MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE TONOPLAST H⁺-ATPASE SUBUNITS

Chen T., Mikhaylova Yu. V., Shishova M. F.

✿ **SUMMARY:** Vacuolar H⁺-ATPase is a multi-subunit protein complex, which fulfills a number of crucial functions in plant cell. Different mechanisms are known to be important for the regulation of proton-transporting enzyme activity at transcriptional and post-translational levels. In this investigation we performed a comparison analysis of molecular phylogeny of different subunits of vacuolar H⁺-ATPase directed in the elucidation of conservative rate of membrane and peripheral complexes of the enzyme. High rate of conservatism was shown for subunits **c**, **d** and **B**, as well as ancient duplications of subunit **a**.

✿ **KEYWORDS:** H⁺-ATPase; tonoplast; vacuole; enzyme activity; phylogenetic tree.

✿ Информация об авторах

Чень Тинчжо — аспирант, кафедра физиологии и биохимии растений. ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет». 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: ctz1985@mail.ru.

Михайлова Юлия Владимировна — м. н. с., лаборатория биосистематики и цитологии. Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук. 193022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. E-mail: YMikhaylova@binran.ru.

Шишова Мария Фёдоровна — профессор, кафедра физиологии и биохимии растений. ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет». 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: mshishova@mail.ru.

Chen Tingzhuo — PhD student, Department of plant physiology and biochemistry. Saint Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya emb., 7/9, Russia. E-mail: ctz1985@mail.ru.

Mikhaylova Yulia Vladimirovna — junior researcher, Laboratory of Biosystematics and Cytology. Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences. 193022, Saint Petersburg, Professora Popova St., 2, Russia. E-mail: YMikhaylova@binran.ru.

Shishova Maria Fiodorovna — Professor, Department of plant physiology and biochemistry. Saint Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya emb., 7/9, Russia. E-mail: mshishova@mail.ru.