

Е.Н. Громозова¹, Т.Л. Качур¹, С.И. Войчук¹, Л.П. Рязанова², Т.В. Кулаковская²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Д 03680, Украина

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, пр. Науки, 5, 142292
Пуцино, Московской обл.

НОВЫЕ АСПЕКТЫ ПЛЕЙОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЭКЗОПОЛИФОСФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

*Инактивация генов основных ферментов деградации полифосфатов, экзополифосфатаз *ppx1* и *ppn1* вызывала не только увеличение содержания полифосфатов, но и увеличение длины цепи кислоторастворимой и щелочерастворимой фракций полифосфатов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Это не оказывало влияния на частоту реакции метахромазии волютиновых гранул, основанную на взаимодействии молекул красителя с ионными группами полифосфатов. В тоже время, в дни отсутствия метахромазии, реакция на нистатин штамма, мутантного по обоим генам, отличалась от реакции родительского штамма и штамма дикого типа. Полученные данные могут свидетельствовать о плеiotропном действии генов *ppx1* и *ppn1*, кодирующих основные экзополифосфатазы *Saccharomyces cerevisiae* и влияющих, посредством изменений в метаболизме полифосфатов, на реакцию клеток к внешним факторам.*

*Ключевые слова: неорганические полифосфаты, экзополифосфатаза, инактивация генов, *Saccharomyces cerevisiae*, нистатин, волютиновые гранулы, реакция метахромазии.*

Неорганические полифосфаты (полиР), линейные полимеры ортофосфорной кислоты, представляют собой полифункциональные соединения, чрезвычайно лабильно реагирующие на условия окружающей среды [1-3]. У дрожжей, в сравнении с прокариотами, реакция полиР на внешние условия изучена в меньшей степени. Эти данные касаются преимущественно влияния избытка и недостатка фосфата, а также влияния источника углерода на накопление и длину цепи этих полимеров [4-7].

В настоящее время получены мутанты с инактивированными генами, кодирующими две основные экзополифосфатазы *Saccharomyces cerevisiae*, ферменты, отщепляющие фосфат с конца полимерной цепи [8, 9]. У двойного мутанта по генам *ppx1* и *ppn1*, наблюдается увеличение содержания полиР и увеличение длины цепи этих полимеров в отдельных клеточных компартаментах [10]. В связи с этим такой мутант представляет собой удобную модель для оценки того, как увеличение содержания полиР в клетке, вследствие изменения набора полиР-гидролизующих ферментов, влияет на различные аспекты жизнедеятельности клеток дрожжей.

Целью данной работы было определение влияния одновременной инактивации генов экзополифосфатаз *ppx1* и *ppn1* на длину цепи полиР отдельных фракций и некоторые физиологические реакции дрожжевых клеток, связанные с метаболизмом полифосфатов: изменение чувствительности к мембранотропному фунгициду нистатину и метахромазия (МТХ) волютиновых гранул.

Материалы и методы. Штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* CRY (родительский штамм) и CNX (штамм с инактивированными генами *ppx1* и *ppn1*) получены из лаборатории Артура Корнберга (Стэнфордский Университет, США) [8]. Штамм *Saccharomyces cerevisiae* УКМ У-517 получен из Украинской коллекции микроорганизмов и не обладает мутациями по данным генам. Штаммы культивировали в аэробных условиях на качалке при 28-30 °С на среде YPD (1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона и 2 % глюкозы), содержащей 6.7мМ ортофосфата, а также на плотной среде сусло-агар. Клетки из стационарной фазы роста (24ч.) [11] осаждали при 5000g в течение 10 мин, промывали стерильной дистиллированной водой и использовали для анализа.

ПолиР экстрагировали из клеток и определяли количественно по содержанию лабильного фосфора как описано ранее [6]. Получали следующие фракции полиР: кислоторастворимую фракцию полиР1 (экстракция 0.5 N HClO₄ при 0°С); солерастворимую фракцию полиР2 (экстракция насыщенным раствором NaClO₄ при 0°С); щелочерастворимую фракцию полиР3

© Е.Н. Громозова, Т.Л. Качур, С.И. Войчук, Л.П. Рязанова, Т.В. Кулаковская, 2012

(экстракция раствором NaOH, pH 9-10, при 0°C); щелочерастворимую фракцию полиР4 (экстракция 0.05 N NaOH при 0°C). Фракция полиР5 представляла собой горячий хлорнокислый экстракт, содержание полиР в котором определяли по количеству Р_p, высвобождающемуся после обработки остаточной биомассы 0.5N HClO₄ при 90 °С в течение 20 мин [6].

Определение длины цепей полиР проводили с помощью электрофореза в 20 % полиакриламидном геле, приготовленном на 200 мМ трис-боратном буфере, pH 8,3, с 7 М раствором мочевины [12]. В качестве метчиков использовали коммерческие полифосфаты с различной средней длиной цепи (Sigma и Monsanto, США). Представлены средние результаты из трех измерений.

Определение повреждающего действия химических соединений оценивали по селективному ингибированию роста штаммов дрожжей, несущих мутации в генах кодирующих экзополифосфатазы, в присутствии фунгицидного антибиотика нистатина. С этой целью использовали штрих-спот-тест [13, 14]. Выявление волутиновых гранул у дрожжей и реакцию метакромазии проводили путём окраски клеток по Лёфлеру [15]. Микроскопию мазков осуществляли с помощью микроскопа Zeiss PrimoStar, оснащенного цифровой фотокамерой Canon Power Shot A640 и программным обеспечением AxioVision Rel. 4.7 (Zeiss). Метахроматическую реакцию оценивали по изменению цвета волутиновых гранул от голубовато-синего до фиолетово-красного. Цитоплазма при этом обесцвечивается либо обладает слабо-голубым окрасом и не влияет на общую оценку метахроматической реакции. Цветность определяли как визуально, так и по интенсивности пиков в режиме RGB.

Полученные результаты обработаны статистически с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc. 2001; www.statsoft.com).

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 показано, что в мутантных клетках *S. cerevisiae* штамм CNX, выращенных в присутствии фосфата на глюкозе, содержится вдвое больше полифосфатов, чем у родительского штамма. Это согласуется с данными, полученными ранее [11]. Следует отметить, что увеличение содержания полиР касается фракций полиР1, полиР2 и полиР3, тогда как фракции полиР4 и полиР5 мало зависели от инактивации генов экзополифосфатаз. Сравнение штамма CRY со штаммом УКМ Y-517, характеризующимся неизменённым фосфорным обменом, показало, что содержание полиР во фракциях полиР1, полиР2, полиР5 было схожим. Однако, существенные отличия наблюдались во фракциях полиР3 и полиР4. У штамма УКМ Y-517 их количество было значительно больше. Длина цепи фракций полиР1 и полиР3 штамма CNX в сравнении с родительским была существенно больше, а фракций полиР2 – в 2 раза меньше. С учетом вклада отдельных фракций в общее содержание полиР, можно считать, что двойной мутант по генам *ppx1* и *ppn1* содержит в целом более длинно-цепочечные полиР. Следовательно, указанные экзополифосфатазы, по-видимому, принимают участие в регуляции не только содержания, но и длины цепи этих полимеров.

Таблица 1

Характеристика фракций полифосфатов исследуемых штаммов *Saccharomyces cerevisiae*.

Фракции	Y-517 (дикий тип)			CRY (родительский штамм)			CNX (с инактивированными генами PPX1 и PPN1)		
	Полифосфаты			Полифосфаты			Полифосфаты		
	мкмоль Р/г сырой биом	%	Длина цепи п	мкмоль Р/г сырой биом	%	Длина цепи п	мкмоль Р/г сырой биом.	%	Длина цепи п
ПолиР ₁	35,1±2,37	36,1	18	34,9±6,9	49,1	18	68,9±8,6	46,9	57
ПолиР ₂	14,1±1,08	14,4	45	13,9±2,1	19,5	45	16,2±2,9	11,0	23
ПолиР ₃	34,5±2,05	35,4	75	17,8±4,8	25,0	33	56,9±18,3	38,7	67
ПолиР ₄	12,5±0,61	12,8	75	3,3±1,4	4,6	45	3,7±3,0	2,5	75
ПолиР ₅	1,3±0,01	1,3	>200	1,2±0,9	1,7	>200	1,2±0,3	0,8	>200
ΣполиР	97,4	100		71	100		147	100	

У двойного мутанта CNX резко снижена активность экзополифосфатазы в вакуолях (55 ед. активности по сравнению с 375 ед. активности в контроле) [10], что одновременно сопровождается увеличением длины цепи полифосфатов до 25-100 фосфорных остатков (ф.о.) по сравнению с 15-25 ф.о. в контроле. Известно, что один из цитохимических мето-

дов выявления длинноцепочечных полифосфатов базируется на метахроматическом сдвиге в спектре поглощения толуидинового синего (от 632 нм до 545 нм) при его связывании с полифосфатами [16]. Метахромазия обусловлена полимеризацией молекул красителя под влиянием свободных отрицательных зарядов биомолекул. Краситель адсорбируется на носителе в виде монослоя. Молекулы красителя разделены между собой молекулой воды. Согласно литературным данным метахромазия отсутствует в случае окраски короткоцепочечных молекул (меньше 10 фосфатных остатков) [17]. В связи с вышесказанным можно предположить, что дефектность дрожжевых клеток по генам, кодирующим экзополифосфатазы, должна существенным образом отразиться на качественных показателях реакции метахромазии волютиновых гранул, в основном локализованных в вакуолях и представленных неорганическими полифосфатами. Сравнительные исследования, проведенные с 24 февраля 2009 г. по 30 сентября 2009 г., позволили установить однотипность в изменении показателя МТХ для всех исследованных штаммов. Во всех случаях корреляционные индексы были достоверны, с коэффициентами 0,60-0,65 (табл. 2). Таким образом, несмотря на изменения в количественном и качественном составе полифосфатов у мутантного штамма это не отразилось на ходе реакции метахромазии. Волютиновые гранулы вакуолей дрожжей содержат в основном кислоторастворимую фракцию полиР [3]. Как видно из данных табл. 1 кислоторастворимая фракция полиР1 у мутантного штамма характеризуется значительной длиной цепи (57 ф.о. против 18 ф.о. у родительского штамма) и представлена большим количеством (69 мкМ/г против 35 мкМ/г биомассы).

Таблица 2

Корреляционные связи между показателем метахромазии (МТХ) и реакцией к нистатину (АЧ) штаммов *Saccharomyces cerevisiae*.

Штамм <i>S. cerevisiae</i>	Исследуемый параметр	Y-517		CRY		CNX	
		МТХ	АЧ	МТХ	АЧ	МТХ	АЧ
Y-517	АЧ	-0.08	-	-0.08	0.44	-0.1	0.23
CRY	МТХ	0.6	-0.08	-	-0.03	0.65	-0.21
	АЧ	-0.12	0.44	-0.03	-	-0.19	0.23
CNX	МТХ	0.65	-0.1	0.65	-0.19	-	-0.07
	АЧ	0.07	0.23	-0.21	0.23	-0.07	-

N = 94, отмеченные корреляции значимы при *p* < 0.05

Помимо известного механизма взаимодействия полианиона с красителем, обуславливающим реакцию МТХ за счёт увеличения длины цепи хромотропного вещества, может рассматриваться и другая схема, например, конформационное изменение полифосфатов волютиновых гранул (в том числе и короткоцепочечных), что в свою очередь может приводить к значительной активации реакционной способности отрицательных зарядов концевых групп. Точнее на этот вопрос можно ответить после детального изучения состава волютиновых гранул в разные временные периоды характеризующиеся наличием или отсутствием реакции метахромазии.

Реакция клеток дрожжей на нистатин не отличалась у всех исследованных штаммов. Однако мутантный штамм отличался от других меньшими корреляционными индексами (табл. 2). Коэффициент корреляции между *S.cerevisiae* УКМ Y-517 и CRY (родительский) составил 44 %, в то время как оба эти штамма коррелировали с мутантом на 23 %, что может свидетельствовать о большем сходстве в проявлении реакции у штаммов УКМ Y-517 и CRY. Представляло интерес исследовать возможность взаимосвязи между реакцией метахромазии волютиновых гранул и устойчивостью к действию нистатина, поскольку согласно литературе оба эти процесса связаны с метаболизмом полифосфатов [3].

Анализ полученных данных показал, что для каждого из исследованных штаммов корреляционная зависимость между показателями чувствительности к нистатину и реакцией метахромазии отсутствует (табл. 2). Однако на следующем этапе мы разбили данные в выборках на две группы в зависимости от дней, в которые отмечалась реакция метахромазии и когда метахроматическая реакция отсутствовала. Обе группы сравнили по средним значениям реакции клеток на нистатин, полученным за каждый месяц наблюдений. Такой подход

к обобщению данных позволил установить, что мутантный штамм характеризуется обратно пропорциональной зависимостью между МТХ и реакцией к нистатину (рисунок): в дни метахроматической окраски волутиновых гранул диаметр зон задержки роста у штамма CNX находился в противофазе к этому показателю.

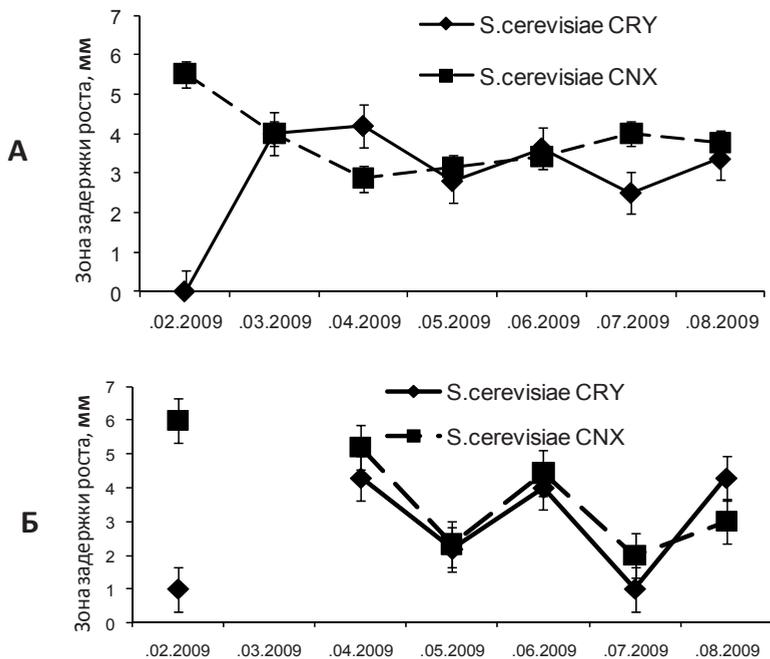


Рисунок. Изменения в показателях зоны ингибирования роста нистатином *S. cerevisiae* CNX и *S. cerevisiae* CRY в дни присутствия метахромазии (А) или отсутствия метахромазии (Б). Разрыв кривой на графике (Б) в месяце марте связано с отсутствием дней без метахромазии в этот месяц.

Если реакция на нистатин характеризует ответ организма на химическое воздействие, то метахроматическая окраска может быть связана с внешними физическими факторами. Как известно, именно эта реакция положена в основу биоастрономического эффекта Чижевского-Вельхова [19]. Её связь с космофизическими факторами была убедительно подтверждена для штамма *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517 в процессе многолетнего ежедневного мониторинга [20].

Таким образом, в ходе исследований не выявлено прямой связи между изменениями в полифосфатном метаболизме клетки и реакцией к нистатину. Однако есть основания предполагать сложный характер взаимодействия между событиями, связанными с изменением полифосфатного пула волутиновых гранул и антибиотикорезистентностью. Полученные данные могут свидетельствовать о плейотропном действии генов *ppx1* и *ppn1*, кодирующих основные экзополифосфатазы *Saccharomyces cerevisiae* и влияющих, посредством изменений в метаболизме полифосфатов, на реакцию клеток к внешним факторам.

О.М. Громозова¹, Т.Л. Качур¹, С.І. Войчук¹, Л.П. Рязанова², Т.В. Кулаковская²

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К. Заболотного НАН України, Київ

² Інститут біохімії і фізіології мікроорганізмів ім. Г.К. Скрябіна РАН, Пуціно, Московської обл.

НОВІ АСПЕКТИ ПЛЕЙОТРОПНОЇ ДІЇ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ ЕКЗОПОЛІФОСФАТАЗИ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Резюме

Інактивація генів основних ферментів деградації поліфосфатів, екзополіфосфатаз *ppx1* і *ppn1*, викликала не тільки збільшення вмісту поліфосфатів, але й збільшення довжини ланцюга кіслоторозчинної і лугорозчинної фракції поліфосфатів у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Це не впливало на частоту реакції метахромазії волютинових гранул, основу на взаємодії молекул барвника з іонними групами поліфосфатів. У той же час, в дні відсутності метахромазії, реакція на ністатин штаму, мутантного за обома генами, відрізнялася від реакції батьківського штаму і штаму дикого типу. Отримані дані можуть свідчити про плеiotропну дію генів *ppx1* і *ppn1*, що кодують основні екзополіфосфатази *Saccharomyces cerevisiae* і, за рахунок змін у метаболізмі поліфосфатів, впливають на реакцію клітин до зовнішніх чинників.

Ключові слова: неорганічні поліфосфати, екзополіфосфатаза, інактивація генів, *Saccharomyces cerevisiae*, ністатин, волютинові гранули, реакція метахромазії.

E.N. Gromozova¹, T.L. Kachur¹, S.I. Voychuk¹, L.P. Ryzanova², T.V. Kulakovskaya²

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

² Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences

NEW ASPECTS OF THE PLEIOTROPIC ACTION OF THE GENES CODING *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EXOPOLYPHOSPHOTASES

Summary

Inactivation of the key genes, which are responsible for the enzymes of polyphosphates degradation, exopolyphosphatases *ppx1* and *ppn1*, caused both an increase of polyphosphates content in *Saccharomyces cerevisiae* cells and an increase in chain length of acid-soluble and alkali-soluble fractions. It had no effect on the frequency of volutine granules metachromasy that was based on the interaction of dye molecules with ionic groups of polyphosphates. At the same time, a mutant strain reaction to nystatin differed from the reaction of the parental and wild-type strains when the metachromasy was absent. Obtained data may indicate a pleiotropic effect of *ppx1* and *ppn1* genes, which encode the major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* and affect the reaction of cells to external factors through changes in the metabolism of polyphosphates.

The paper is presented in Russian.

Ключові слова: неорганічні поліфосфати, екзополіфосфатаза, інактивація генів, *Saccharomyces cerevisiae*, ністатин, волютинові гранули, метахроматична реакція.

The author's address: Gromozova E.N., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Kornberg A., Rao N.N., Ault-Riché D. Inorganic Polyphosphate: a molecule with many functions // Ann. Rev. Biochem. – 1999. – 68. – P. 89–125.
2. Shiba T., Tsutsumi K., Yano H., Ihara Y., Kameda A., Tanaka K., Takahashi H., Munekata M., Rao N.N., Kornberg A. Inorganic polyphosphate and the induction of RPOS expression // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – 94. – P. 11210–11215.
3. Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокмолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. – М.: Научный мир, 2005. – 215с.
4. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кулаев И.С. Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей // Биохимия. - 2000. – 65. – С. 414–420.
5. Личко Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаковская Е.В., Кулаев И.С. Инактивація генів Ppx1 і Ppn1, кодуючих екзополіфосфатази дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* не перешкоджає використанню поліфосфатів в якості фосфорних резервів // Биохимия. – 2008. – 73. – С. 1224–1229.

6. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кулаковская Е.В., Кулаев И.С. Содержание неорганических полифосфатов при росте *Saccharomyces cerevisiae* на разных источниках углеродного питания и при разном содержании O₂ в среде // Микробиология. – 2008. – 77, №5. – С. 611–616.
7. Vagabov V.M., Trilisenko L.V., Kulakovskaya T.V., Kulaev I.S. Effect of carbon source on polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. – 2008. – 8. – P. 877– 882.
8. Sethuraman A., Rao N.N., Kornberg A. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – 98. – P. 8542–8547.
9. Shi X., Kornberg A. Endopolyphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* undergoes post-translational activations to produce short-chain polyphosphates // FEBS Lett. – 2005. – 579. – P. 2014–2018.
10. Lichko L., Kulakovskaya T., Pestov N., Kulaev I. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of PPX1 and PPN1 genes // Biosci. Rep. – 2006. – 26, N 1. – P. 45– 54.
11. Кулаковская Т.В., Трилисенко Л.В., Личко Л.П., Кулаев И.С. Влияние инактивации генов экзополифосфатазы PPX1 и эндополифосфатазы PPN1 на содержание полифосфатов различных фракций у *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. – 2006. – 75. – С. 35–39.
12. Личко Л.П. Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. Неорганические полифосфаты и экзополифосфатазы различных компарментов клеток *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. – 2006. – 71. – С. 1445–1450.
13. Shirasu Y., Moria M., Kato K. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system // Mutat. Res. – 1976. – 40. – P. 19–30.
14. Takigami H., Matsui S., Matsuda T., Shimizu Y. The *Bacillus subtilis* rec-assay: a powerful tool for the detection of genotoxic substances in the water environment. Prospect for assessing potential impact of pollutants from stabilized wastes // Waste Management. – 2002. – 22, N 2. – P. 209– 213.
15. Практикум по микробиологии : Учебное пособие / Под ред. Н.С.Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – С. 133.
16. Serafim L.S., Lemos P.C., Levantesi C., Tandoi V., Santos H., Reis M.A. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms // J. Microbiol. Methods. – 2002. – 51, N 1. – P. 1–18.
17. Lorenz B., Schroder H.C. Methods for investigation of inorganic polyphosphates and polyphosphate-metabolizing enzymes // Inorganic Polyphosphates. Biochemistry, Biology, Biotechnol / (eds. H.C.Schroder, W.E.G.Muller). – Springer. – Prog. Mol. Cell. Biol. – 1999. – 23. – P. 217– 241.
18. Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокмолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. – М.: Научный мир, 2005. – 216 с.
19. Краткий справочник по космической биологии и медицине. – М.: Медицина, 1967. – 296 с.
20. Громозова Е.Н., Григорьев П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.И. Влияние космофизических факторов на реакцию метахромазии волютиновых гранул *Saccharomyces cervisiae* // Биофизические процессы и биосфера. – 2010. – 9, № 2. – С. 67–76.

Отримано 19.05.2011