

СВЯЗЬ ПОДВИЖНОСТИ ВОЛЮТИНОВЫХ ГРАНУЛ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* С ЭКЗОПОЛИФОСФАТАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

М.С. Харчук, Е.Н. Грамозова

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Акад. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина
e-mail: sithmcx@ukr.net*

*Невзирая на давнюю историю открытия, подвижные вакуолярные волютиновые (полифосфатные) гранулы дрожжей, известные более как “dancing bodies”, остаются по-прежнему малоизученными. Цель. Выявить наличие связи между подвижностью волютиновых гранул и экзополифосфатазной активностью у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в условиях стресса. Методы. В работе использовались цитологические, биохимические и статистические методы исследования. Результаты. Установлено, что в условиях гипо- и гиперосмотического, щелочного, кислотного, окислительного и спиртового стрессов у штаммов с неизменённым фосфорным обменом УКМ Y-517 и CRУ наблюдалось снижение количества клеток с подвижными волютиновыми гранулами (показатель “dancing bodies”) одновременно с содержанием кислоторастворимой фракции полифосфатов (фракция ПолиФ1) и в большинстве случаев с жизнеспособностью. В отличие от родительского штамма CRУ, мутантный штамм CRN с инактивированным геном, кодирующим экзополифосфатазу *Ppp1*, характеризовался незначительным увеличением показателя “dancing bodies” при щелочном (10 мМ гидроксид аммония) и гипотоническом стрессах. Экзополифосфатазная активность (ЭПФА) у всех исследуемых штаммов в большинстве случаев снижалась. Однако она увеличивалась в условиях щелочной (10 мМ гидроксид аммония) и гипотонической среды, а также при спиртовом стрессе у мутантного штамма. С помощью линейного корреляционного анализа было установлено, что у штаммов с неизменённым фосфорным метаболизмом показатель “dancing bodies” имеет достоверную связь с фракцией ПолиФ1 и жизнеспособностью. У мутантного штамма количество клеток с подвижными волютиновыми гранулами коррелирует с ЭПФА и фракцией ПолиФ1. Факторным анализом было показано, что у штаммов УКМ Y-517 и CRУ показатель “dancing bodies”, фракция ПолиФ1 и жизнеспособность связаны между собой. У мутантного штамма обнаружена корреляция между показателем “dancing bodies”, фракцией ПолиФ1 и ЭПФА. Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что подвижность волютиновых гранул *S. cerevisiae* связана с фосфорным метаболизмом и реагирует на стрессовые воздействия. Выдвигается гипотеза о возможном участии в появлении “dancing bodies” вакуолярных экзополифосфатаз.*

Ключевые слова: волютиновые гранулы, “dancing bodies”, экзополифосфатаза, полифосфаты, дрожжи, стрессы.

Клетки многих микроорганизмов могут содержать волютиновые гранулы – скопления полифосфатов (линейных конденсированных фосфатов, связанных между собой высокоэнергетическими фосфоангидридными связями [1]), которые находятся в комплексе с катионами металлов,

белками и позитивно заряженными аминокислотами [1, 2]. Они характеризуются метахроматическим окрашиванием при использовании основных красителей, устойчивой жёлтой флуоресценцией при применении 4',6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорида (DAPI) и фиксируются как электронно-плотные образования без контрастирования при использовании трансмиссионной электронной микроскопии [1, 3, 4]. Кроме того, одной из особенностей волютиновых гранул является их подвижность в вакуолярном пространстве дрожжевых клеток. В литературе такие гранулы более известны как “dancing bodies” («танцующие тела») [5]. Движение вакуолярных волютиновых гранул неоднократно отмечалось в ряде исследований [2, 5, 6] как броуновское. Однако это явление до сих пор остаётся малоизученным.

Длительное время считалось, что волютиновые гранулы функционируют как депо фосфора и энергии [1]. Тем не менее, современные данные дают возможность предположить, что их физиологическая роль гораздо шире. Есть свидетельства об участии полифосфатсодержащих гранул в клеточных ответах на щелочной [7, 8], кислотный [9, 10], окислительный [11, 12], осмотический [8, 13, 14] и тепловой [15] стрессы, высокие концентрации солей [13, 14] и катионов токсических металлов [16, 17], действие ионизирующей радиации [18], дисбаланс в питательных веществах [19, 20]. Учитывая вышесказанное, целью данной работы было установить наличие связи подвижности волютиновых гранул с экзополифосфатазной активностью у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в условиях стресса.

Материалы и методы. Объектами исследования были штаммы дрожжей *S. cerevisiae* с неизменённым фосфорным обменом CRU и УКМ Y-517, а также штамм CRN с инактивированным геном *PPN1*, кодирующим соответствующую полифосфатазу Ppn1 (КФ 3.6.1.11)). Штаммы CRU и CRN, созданные в лаборатории А. Корнберга из штамма W 303-1А Американской коллекции типовых культур (ATCC) [21, 22], были любезно предоставлены д.б.н. Т.В. Кулаковской (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Россия). Штамм УКМ Y-517 получен из Украинской коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.

Культуры выращивали на среде сусло-агар при 28°C в течение 24 часов. Клетки смывали стерильной дистиллированной водой и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин. После чего их подвергали стрессовым воздействиям в течение 24 часов при 28°C.

Факторами стресса были: дистиллированная вода (гипотонический стресс) и 1 М сорбитол (гипертонический стресс), 10 и 100 мМ гидроксид аммония (щелочной стресс), 10 и 100 мМ уксусная кислота (кислотный стресс), 10 и 100 мМ перекись водорода (окислительный стресс), 10% этанол (спиртовой стресс). Контролем была суспензия клеток в физиологическом растворе (рН 7,0).

Жизнеспособность клеток определяли по образованию колоний на суло-агаре при 28°C в течение 24-48 часов (метод Коха).

Подвижность волютиновых гранул (показатель “dancing bodies”) исследовали с помощью люминесцентной микроскопии (Ulab LW300TF,

Ulab, Китай) с использованием флуоресцентного витального красителя 4',6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорида (DAPI, «Sigma», USA) в конечной концентрации 5 мг/л [2]. Подсчёт клеток проводили в 15-20 полях зрения препарата. Учитывали клетки, которые содержали как подвижные, так и неподвижные волутиновые гранулы, которые характеризовались ярко-жёлтой флуоресценцией. Количество клеток с “dancing bodies” выражали в процентах по отношению к общему количеству клеток с волутиновыми гранулами.

Для получения клеточного гомогената клетки смывали холодной дистиллированной водой и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин. Осадок ресуспендировали в холодном 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,2) с 2,5 мМ MgSO₄. К полученной суспензии клеток добавляли стеклянные шарики диаметром 0,5 мм (Bertin Technologies, Франция). Клетки разрушали механически постоянным встряхиванием на шейкере MSV-3500 (BioSan, Латвия) при 3500 об/мин по 15 мин, с перерывами для охлаждения по 5 мин. Анализ разрушения клеток проводили с помощью световой микроскопии. Разрушенные клетки становились прозрачными без светопреломляющего внутриклеточного содержимого.

Экзополифосфатазную активность определяли по образованию ортофосфата из полифосфата (субстрат) под действием клеточного гомогената. Реакционная смесь содержала клеточный гомогенат, 50 мМ Tris-НСl буфер (рН 7,2), 2,5 мМ MgSO₄ и 50 мкМ полифосфата со средней длиной цепи 200 фосфатных остатков. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 минут при 28°C. За миллиединицу активности (мЕ) принимали количество фермента, образующего 1 нмоль ортофосфата за 1 мин [23]. Удельную активность выражали в миллиединицах активности на 1 мг белка (мЕ/мг белка).

Кислоторастворимую фракцию полифосфатов экстрагировали из клеток в 0,5 М HClO₄ при 0°C в течение 15 мин по методу Лангена и Лисса в модификации Кулаева и соавт. [1]. Полученный экстракт полифосфатов гидролизovali до ортофосфата в 1 М HCl при 100°C в течение 15 мин. За единицу количества полифосфатов в клетке принимали количество образовавшегося после гидролиза ортофосфата по отношению к 1 мг белка.

Концентрацию ортофосфата в образцах определяли колориметрически. Для этого использовали реактив А (2% серная кислота, 0,5% молибдат аммония, 0,5% додецилсульфат натрия в дистиллированной воде) и реактив В (10% водный раствор аскорбиновой кислоты). Реактивы А и В смешивали в соотношении 100:1 соответственно. Полученную смесь добавляли к пробе в соотношении 2:1 (реактив АВ: проба) и инкубировали в течение 10 мин при 28°C. После инкубирования определяли оптическую плотность пробы при длине волны 750 нм [1].

Концентрацию белка определяли методом Бредфорда [24]. Стандартом служил бычий сывороточный альбумин.

Полученные данные были статистически обработаны методами линейного корреляционного анализа и факторного анализа по методу главных компонент. Значимыми считали нагрузки с коэффициентом Пирсона $R \geq 0,7$. Расчёты были выполнены с помощью компьютерной программы *Statistica 10* (StatSoft., Inc. 2011).

Результаты. Установлено, что исследуемые штаммы дрожжей *S. cerevisiae* в контрольных образцах отличались друг от друга (табл. 1-2, контроль 2). Учитывая то, что в вакуолях и волютиновых гранулах *S. cerevisiae* преобладает кислоторастворимая фракция полифосфатов [1, 25, 26], мы определяли её содержание в клетках. Обнаружено, что у штамма CRU в ~1,2 раза больше кислоторастворимых полифосфатов (табл.1) и в ~1,4 раза меньше клеток с подвижными волютиновыми гранулами (табл.2), чем у другого штамма с неизменённым фосфорным метаболизмом УКМ Y-517 (рис.1). Штамм CRN, лишённый полифосфатазы Ppn1, существенно отличался от родительского штамма CRU по количеству полифосфатов кислоторастворимой фракции и показателю “dancing bodies” (они были меньшими в ~2,4 и ~1,5 раза соответственно). Следует отметить, что кратковременное использование дистиллированной воды (2 мин) при отмывке клеток от питательной среды не влияло на исследуемые параметры (табл.1-2, контроль 1).

Гипотонический стресс не оказывал влияния на жизнеспособность клеток всех исследуемых штаммов (табл.3). Однако показатели полифосфатного обмена свидетельствовали о физиологических изменениях, происходящих под его воздействием. Наблюдалось повышение экзополифосфатазной активности (табл.1), что приводило к гидролизу полифосфатов кислоторастворимой фракции (табл.1). Показатель “dancing bodies” у штаммов с неизменённым фосфорным обменом УКМ Y-517 и CRU снижался (табл.2). Мутантный штамм CRN, неспособный синтезировать полифосфатазу Ppn1, наоборот, характеризовался небольшим увеличением количества клеток с подвижными волютиновыми гранулами. Таким образом, полифосфатный обмен и показатель “dancing bodies” являются довольно чувствительными к гипоосмотическому стрессу.

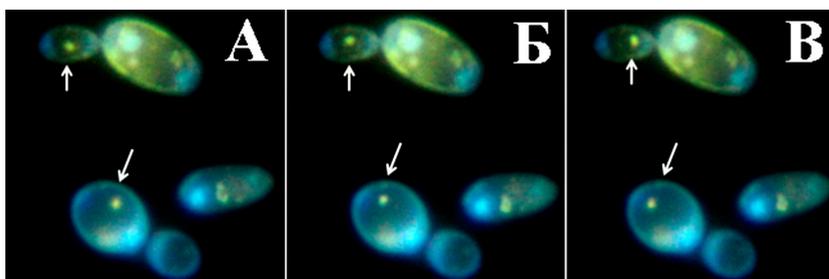


Рис.1. Клетки *S. cerevisiae* УКМ Y-517, окрашенные DAPI (5 мг/мл). Волютиновые гранулы характеризуются ярко-жёлтой флуоресценцией. В серии фотографий А-В показано изменение положения внутри вакуолей “dancing bodies” во времени (отмечено белыми стрелками). Увеличение $\times 1500$.

Гиперосмотический стресс, вызванный 1 М сорбитолом, не оказывал заметного влияния на жизнеспособность клеток штамма УКМ Y-517. Напротив, штаммы CRU и CRN оказались в равной степени чувствительными к гипертоничности среды (табл.3). Из этого следует, что инактивация гена *PPN1* не влияет на жизнеспособность при гиперосмотическом

Таблица 1

Содержание кислоторастворимых полифосфатов (ПФ1, мкмоль P_i/ мг белка) и экзополифосфатазная активность (ЭПФА, мЕ/ мг белка) дрожжей *S. cerevisiae* с изменённым (CRN) и неизменённым фосфорным метаболизмом (CRY и УКМ Y-517) в условиях стресса

Фактор стресса	УКМ Y-517		CRY (родитель)		CRN (мутант, <i>ΔPPN1</i>)	
	ПФ1	ЭПФА	ПФ1	ЭПФА	ПФ1	ЭПФА
контроль1	26,6±6,1	311±6	28,9±0,7	307±16	15,8±3,5	282±13
контроль2	26,8±2,5	311±13	31,5±3,1	307±15	13,1±0,7	288±4
дистиллированная вода	21,6±1,2	330±3	24,2±1,2	354±6	12,0±0,2	334±17
1 М сорбитол	18,0±0,5	294±3	18,5±1,0	269±7	10,4±0,9	288±5
10 мМ гидроксид аммония	6,8±0,1	339±6	8,1±0,2	328±4	11,5±0,3	345±7
100 мМ гидроксид аммония	4,6±0,1	262±7	4,0±0,3	240±7	6,0±0,1	227±5
10 мМ уксусная кислота	15,6±0,8	264±9	13,0±0,4	228±4	9,0±0,7	227±6
100 мМ уксусная кислота	18,5±1,0	249±2	16,4±0,8	225±5	6,2±0,2	209±3
10 мМ пероксид водорода	16,6±0,7	286±9	9,8±0,1	271±5	7,9±0,6	204±3
100 мМ пероксид водорода	12,7±0,3	242±3	8,4±0,2	226±3	7,4±0,2	197±4
10% этанол	18,8±0,7	271±4	13,3±0,5	268±4	8,5±0,2	325±2

«контроль 1» – клетки, находившиеся в течение 2 мин в дистиллированной воде во время отмычки от питательной среды

«контроль 2» – клетки, находившиеся в течение 24 ч в физиологическом растворе

Таблица 2

Показатель “dancing bodies” (%) дрожжей *S. cerevisiae* с изменённым (CRN) и неизменённым фосфорным метаболизмом (CRY и УКМ Y-517) в условиях стресса

Фактор стресса	УКМ Y-517	CRY (родитель)	CRN (мутант, <i>ΔPPN1</i>)
контроль1	27±3	21±2	13±2
контроль2	27±5	20±5	13±2
дистиллированная вода	18±3	17±2	15±4
1 М сорбитол	11±5	10±3	9±4
10 мМ гидроксид аммония	6±2	6±3	20±6
100 мМ гидроксид аммония	0	0	3±2
10 мМ уксусная кислота	4±1	7±2	7±1
100 мМ уксусная кислота	0	0	0
10 мМ пероксид водорода	0	0	0
100 мМ пероксид водорода	0	0	0
10% этанол	10±2	9±3	11±2

«0» – клеток с подвижными волнатиновыми гранулами не обнаружено

«контроль 1» – клетки, находившиеся в течение 2 мин в дистиллированной воде во время отмычки от питательной среды

«контроль 2» – из клеток, находившихся в течение 24 ч в физиологическом растворе

Таблица 3

Жизнеспособность (% колониеобразующих единиц) дрожжей *S. cerevisiae* с изменённым (CRN) и неизменённым фосфорным метаболизмом (CRY и УКМ Y-517) в условиях стресса

Фактор стресса	УКМ Y-517	CRY (родитель)	CRN (мутант, <i>ΔPPN1</i>)
контроль	100±17	100±12	100±5
дистиллированная вода	94±11	91±4	91±10
1 М сорбитол	93±19	66±14	62±14
10 мМ гидроксид аммония	14±9	3±3	3±3
100 мМ гидроксид аммония	1±1	1±1	1±1
10 мМ уксусная кислота	23±2	23±5	39±9
100 мМ уксусная кислота	3±2	3±2	3±3
10 мМ пероксид водорода	20±3	14±5	0
100 мМ пероксид водорода	0	0	0
10% этанол	53±7	35±3	34±15

«0» – колонии клеток не образовывались

«контроль» – колонии клеток, находившихся в течение 24 ч в физиологическом растворе

стрессе. Возможно, повышенная чувствительность штаммов CRY и CRN вызвана наличием у них мутаций, не связанных с полифосфатным метаболизмом [21, 22]. В отличие от гипоосмотического стресса, гипертонический шок приводил к снижению экзополифосфатазной активности у всех исследуемых штаммов (табл.1). Содержание кислоторастворимых полифосфатов также уменьшалось (табл.1) одновременно с количеством клеток с подвижными волютиновыми гранулами (табл.2). Таким образом, мутация в гене, кодирующем полифосфатазу Ppn1, не влияет на жизнеспособность клеток дрожжей в условиях гиперосмотического стресса. Однако этот стресс определённо вызывает изменения в полифосфатном обмене, что также отображается в количестве клеток с подвижными волютиновыми гранулами.

При защелачивании среды 10 мМ гидроксидом аммония у всех исследуемых штаммов жизнеспособность клеток существенно снижалась, тогда как при 100 мМ отмечалась их 99% гибель (табл.3). Экзополифосфатазная активность возрастала при 10 мМ гидроксида аммония (табл.1). Однако при его концентрации в 100 мМ она снижалась. Действие гидроксида аммония вызывало существенное уменьшение кислоторастворимых полифосфатов в ~4 раза при 10 мМ у штаммов УКМ Y-517 и CRY и в ~2 раза при 100 мМ у штамма CRN (табл.1). Одновременно с гидролизом полифосфатов у УКМ Y-517 и CRY наблюдалось значительное уменьшение количества клеток с подвижными волютиновыми гранулами (табл.2). При 100 мМ гидроксида аммония клеток с “dancing bodies” не наблюдалось. В отличие от штаммов УКМ Y-517 и CRY, у штамма CRN при 10 мМ гидроксида аммония происходило увеличение в 1,5 раза показателя “dancing bodies” (табл.2). Однако при его концентрации в 100 мМ у этого штамма наблюдались единичные клетки с подвижными волютиновыми гранулами. Таким образом, щелочной стресс оказывает сильное воздействие на все исследуемые штаммы, что сопровождается заметными изменениями в полифосфатном обмене и подвижности волютиновых гранул.

Кислотный стресс, вызванный внесением 10 и 100 мМ уксусной кислоты, у всех исследуемых штаммов существенно снижал жизнеспособность клеток (табл.3) одновременно с уменьшением экзополифосфатазной активности, количества кислоторастворимых полифосфатов (табл.1) и показателя “dancing bodies” (табл.2). Таким образом, кислотный стресс влияет как на полифосфатный обмен, так и на подвижность волютиновых гранул.

Окислительный стресс оказывал сильное отрицательное воздействие на жизнеспособность штаммов УКМ Y-517 и CRU при 10 мМ перекиси водорода вплоть до 100% гибели клеток при её концентрации в 100 мМ (табл.3). В то же время штамм CRN оказался более чувствительным к окислительному стрессу – 100% гибель клеток наблюдалась уже при 10 мМ перекиси водорода, что согласуется с литературными данными [23]. Отмечается, что штаммы с инактивированным геном *PPN1* имеют дефектные по респираторной функции митохондрии. А, как известно, дрожжи с мутациями, снижающими активность митохондрий, более чувствительны к окислительному стрессу [27]. Экзополифосфатазная активность у всех исследуемых штаммов уменьшалась одновременно с содержанием полифосфатов кислоторастворимой фракции (табл.1). Подвижность волютиновых гранул в условиях окислительного стресса полностью ингибировалась (табл.2) даже при сохранении жизнеспособности части клеток у штаммов с неизменённым фосфорным метаболизмом УКМ Y-517 и CRU при концентрации 10 мМ перекиси водорода. Это может свидетельствовать о связи “dancing bodies” с активными метаболическими процессами. Таким образом, полифосфатный метаболизм и подвижность волютиновых гранул очень чувствительны к окислительному стрессу.

При спиртовом стрессе, вызванным 10% этанолом, наблюдалось снижение жизнеспособности клеток у всех исследуемых штаммов (табл.3), особенно у CRU и CRN. Экзополифосфатазная активность у штаммов УКМ Y-517 и CRU заметно уменьшалась (табл.1). В отличие от них, штамм CRN характеризовался повышением этой активности. Количество полифосфатов кислоторастворимой фракции у всех исследуемых штаммов существенно снижался (табл.1). Показатель “dancing bodies” заметно уменьшался только у штаммов с неизменённым полифосфатным метаболизмом УКМ Y-517 и CRU (табл.2). Таким образом, спиртовой стресс оказывает сильное воздействие на полифосфатный метаболизм и на подвижность волютиновых гранул.

С помощью линейного корреляционного анализа было установлено, что у штамма УКМ Y-517 показатель “dancing bodies” достоверно связан с жизнеспособностью ($r = 0,91, p < 0,05$) и содержанием кислоторастворимых полифосфатов ($r = 0,71, p < 0,05$) (табл.4). В отличие от него, штамм CRU характеризовался достоверной связью количества подвижных волютиновых гранул со всеми исследуемыми параметрами (табл.4). У штамма CRN показатель “dancing bodies” коррелировал с экзополифосфатазной активностью ($r = 0,95, p < 0,05$) и количеством кислоторастворимых полифосфатов ($r = 0,84, p < 0,05$) (табл.4). С помощью факторного анализа установлено, что у штаммов с неизменённым фосфорным метаболизмом УКМ Y-517 и CRU количество клеток с подвижными волютиновыми гра-

нулами, жизнеспособность и содержание полифосфатов кислоторастворимой фракции связаны между собой (табл. 5). У штамма CRN отмечена связь между всеми исследуемыми параметрами (табл. 5). Таким образом, результаты статистического анализа согласуются с нашими наблюдениями. В контрольных образцах не во всех клетках отмечались подвижные волутиновые гранулы. Однако в условиях стресса у штаммов УКМ Y-517 и CRN показатель “dancing bodies” снижался пропорционально с жизнеспособностью. В то же время у мутантного штамма CRN такой закономерности не наблюдалось. Кроме того, данные статистического анализа дают возможность предположить, что подвижные волутиновые гранулы связаны с полифосфатным метаболизмом. На это указывает то, что

Таблица 4

**Корреляционные связи между жизнеспособностью (ЖС),
экзополифосфатазной активностью (ЭПФА), содержанием
полифосфатов кислоторастворимой фракции (ПФ1) и показателем
“dancing bodies” (DB), полученные линейным корреляционным
анализом ($p < 0,05$)**

	параметры	ЖС	ЭПФА	ПФ1	DB
УКМ Y-517	ЖС	1,00	0,58	0,71*	0,91*
	ЭПФА	0,58	1,00	0,08	0,63
	ПФ1	0,71*	0,08	1,00	0,71*
	DB	0,91*	0,63	0,71*	1,00
CRN (родитель)	параметры	ЖС	ЭПФА	ПФ1	DB
	ЖС	1,00	0,62	0,91*	0,94*
	ЭПФА	0,62	1,00	0,48	0,70*
	ПФ1	0,91*	0,48	1,00	0,87*
	DB	0,94*	0,70*	0,87*	1,00
CRN (мутант, ΔPPN1)	параметры	ЖС	ЭПФА	ПФ1	DB
	ЖС	1,00	0,53	0,79*	0,54
	ЭПФА	0,53	1,00	0,74*	0,95*
	ПФ1	0,79*	0,74*	1,00	0,84*
	DB	0,54	0,95*	0,84*	1,00

«*» – статистически достоверные корреляционные связи при $p < 0,05$

Таблица 5

**Корреляционные связи между жизнеспособностью (ЖС),
экзополифосфатазной активностью (ЭПФА), содержанием
полифосфатов кислоторастворимой фракции (ПФ1) и показателем
“dancing bodies” (DB), полученные факторным анализом по методу
главных факторов (общности = множ. R^2 , отмеченные
нагрузки $> 0,70$)**

	УКМ Y-517	CRN (родитель)	CRN (мутант, ΔPPN1)
ЖС	-0,94*	-0,97*	-0,73*
ЭПФА	-0,60	-0,67	-0,90*
ПФ1	-0,72*	-0,89*	-0,93*
DB	-0,96*	-0,97*	-0,95*
Доля общности**	67%	78%	77%

«*» – статистически достоверные корреляционные связи со значимыми нагрузками $R > 0,70$

«**» – процент объяснённой дисперсии

показатель “dancing bodies” достоверно коррелировал с кислоторастворимой фракцией полифосфатов у всех исследуемых штаммов и имел выраженную связь с экзополифосфатазной активностью у мутантного штамма CRN.

Обсуждение. В литературе есть примеры векторизованного движения волютиновых гранул. Так, у *Acetabularia acetabulum* (*A. mediterranea*) они перемещались совместно с другими органеллами и внутриклеточными компонентами во время течения цитоплазмы (циклоза) [28]. Однако характер такого перемещения волютиновых гранул явно отличается от их движения в вакуолях дрожжей. Есть лишь косвенные свидетельства об участии биологических процессов в появлении “dancing bodies”. Так, в работе Naito et al. [29] сообщается, что подвижная волютиновая гранула останавливалась после прекращения митохондриальной активности в клетках *S. cerevisiae* во время развития спонтанного апоптоза. Волютиновые гранулы также начинали активно двигаться в дрожжевых вакуолях под действием нелетальной дозы антибиотика окцидиофунгина [30]. Возможно, это связано с повышением экзополифосфатазной активности и деградацией длинноцепочечных полифосфатов, которое наблюдается при апоптозе [31] и некоторых видах стрессов [17, 32]. Известно, что у дрожжей *S. cerevisiae* основными экзополифосфатазами являются ферменты, кодируемые генами *PPX1* и *PPN1*. Они отличаются по структуре, локализации и предпочтительному субстрату. Экзополифосфатаза Ppx1 имеет высокую аффинность к короткоцепочечным полифосфатам. Её активность обнаруживается в клеточной оболочке, растворимой фракции митохондрий и цитозоле. Экзополифосфатаза Ppn1 предпочитает катализировать отщепление ортофосфата от длинноцепочечных полифосфатов. Этот фермент также имеет эндополифосфатазную активность (расщепляет длинную цепь полифосфата на более короткие цепи). Экзополифосфатаза Ppn1 локализуется в цитозоле, нерастворимой фракции митохондрий, ядре и вакуолях [1, 26, 33]. Следует также отметить, что она вносит более весомый вклад в полифосфатный метаболизм, чем экзополифосфатаза Ppx1 [34, 35]. Кроме экзополифосфатаз Ppx1 и Ppn1, есть ещё одна экзополифосфатаза, которая была обнаружена в вакуолях двойного мутантного штамма с инактивированными генами *PPX1* и *PPN1* [26]. Роль этого фермента в полифосфатном метаболизме остаётся неизвестной, поскольку его активность не всегда наблюдается. Возможно, он функционирует только в определённых условиях [35]. В наших исследованиях штамм CRN с инактивированным геном *PPN1* обладал высокой общей экзополифосфатазной активностью, что ранее для него не отмечалось [26]. Предположительно, это связано с увеличением активности экзополифосфатазы, некодируемой генами *PPX1* и *PPN1*. Следует отметить, что в контрольном образце у штамма CRN наблюдалось в 1,5 раза меньшее количество клеток с “dancing bodies”. Известно, что вклад фермента Ppn1 может достигать до 70% от общей вакуолярной экзополифосфатазной активности [26]. Это может свидетельствовать об определённом участии обеих экзополифосфатаз вакуолей в подвижности волютиновых гранул. Гипотетически, механизм их действия может заключаться в том, что при отщеплении ортофосфата от цепи полифосфата, выделяемая энергия,

близкая к энергии гидролиза макроэргической связи АТФ, не затрачивается на конкретный процесс, а рассеивается в виде тепла. Это тепло, образуя локальное расширение вакуолярной жидкости и впоследствии конвекционные потоки в месте взаимодействия экзополифосфатазы с волютиновой гранулой, приводит к появлению “dancing bodies”. Определённо такое движение волютиновых гранул не будет векторизованным. Учитывая то, что движение, основанное на механохимических преобразованиях энергии, является одним из первых типов перемещения макромолекул в пространстве [36], а неорганические полифосфаты сыграли важную роль в биологической эволюции [1], “dancing bodies”, возможно, сохранились как результат раннего взаимодействия полифосфатаз с полифосфатами.

Таким образом, согласно полученным результатам, подвижность волютиновых гранул связана с фосфорным обменом и изменяется в стрессовых условиях. Предположительно, в возникновении “dancing bodies” важную роль могут играть вакуолярные ферменты полифосфатного метаболизма.

ЗВ’ЯЗОК РУХЛИВОСТІ ВОЛЮТИНОВИХ ГРАНУЛ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* З ЕКЗОПОЛІФОСФАТАЗНОЮ АКТИВНІСТЮ В СТРЕСОВИХ УМОВАХ

М.С. Харчук, О.М. Громозова

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

Резюме

Незважаючи на давню історію відкриття, вакуолярні рухливі волютинові (поліфосфатні) гранули дріжджів, які відомі більше як “dancing bodies”, залишаються донині маловивченими. **Мета.** Виявити наявність зв’язку між рухливістю волютинових гранул і екзополіфосфатазною активністю у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* в умовах стресу. **Методи.** В роботі використовувалися цитологічні, біохімічні і статистичні методи дослідження. **Результати.** Встановлено, що в умовах гіпо- і гіперосмотичного, лужного, кислотного, окисного і спиртового стресів у штамів з незмінним фосфорним обміном УКМ Y-517 і CRU спостерігалось зниження кількості клітин з рухливими волютиновими гранулами (показник “dancing bodies”) одночасно із вмістом кислоторозчинної фракції поліфосфатів (фракція ПоліФ1) і в більшості випадків з життєздатністю. На відміну від батьківського штаму CRU, мутантний штам CRN з інактивованим геном, який кодує екзополіфосфатазу Ppn1, характеризувався невеликим збільшенням показника “dancing bodies” при лужному (10 мМ гідроксид амонію) і гіпоосмотичному стресах. Екзополіфосфатазна активність (ЕПФА) у всіх досліджуваних штамів у більшості випадків знижувалася. Проте вона збільшувалась в умовах лужного (10 мМ гідроксид амонію) і гіпотонічного середовища, а також за спиртового стресу у мутантного штаму. За допомогою лінійного кореляційного аналізу було встановлено, що у штамів з незмінним фосфорним метаболізмом показник “dancing bodies” має достовірний зв’язок з фракцією ПоліФ1 і життєздатністю. У мутантного штаму кількість клітин з рухливими волютиновими гранулами корелює з ЕПФА і фракцією ПоліФ1. Факторним аналізом було показано, що у штамів УКМ

Y-517 і CRY показник “dancing bodies”, фракція ПоліФ1 і життєздатність зв’язані між собою. У мутантного штаму виявлена кореляція між показником “dancing bodies”, фракцією ПоліФ1 і ЕПФА. **Висновки.** Отримані дані свідчать про те, що рухливість волютинових гранул *S. cerevisiae* пов’язана з фосфорним метаболізмом і реагує на стресові впливи. Висувається гіпотеза про можливу участь в появі “dancing bodies” вакуолярних екзополіфосфатаз.

Ключові слова: волютинові гранули, “dancing bodies”, екзополіфосфатаза, поліфосфати, дріжджі, стреси.

THE CONNECTION OF VOLUTIN GRANULES MOTION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WITH EXOPOLYPHOSPHATASE ACTIVITY UNDER STRESS CONDITIONS

M.S. Kharchuk, E.N. Gromozova

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Despite the long history of discovery, vacuolar moving of volutin (polyphosphate) granules of yeast, which are known more as “dancing bodies”, still remain poorly studied. **Aim.** This work was aimed at identification the presence of the connection between volutin granule motion and exopolyphosphatase activity in yeast *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. **Methods.** Cytological, biochemical and statistical methods of studies were used in this work. **Results.** The number of cells with moving volutine granules (“dancing bodies” index) in strains with unchanged phosphorus metabolism of UCM Y-517 and CRY decreased simultaneously with the content of acid-soluble polyphosphate fraction (PolyP1 fraction) and, in most cases, with the cells viability under hypo- and hyperosmotic, alkaline, acidic, oxidative and alcoholic stresses. In contrast to parental strain of CRY, strain of CRN with inactivated encoding exopolyphosphatase Ppn1 gene, showed slight increasing in “dancing bodies” index under alkaline (10 mM ammonium hydroxide) and hypoosmotic stresses. In most cases, exopolyphosphatase activity (EPPA) in all studied strains decreased. However, it increased under the conditions of alkaline (10 mM ammonium hydroxide) and hypotonic medium, and also under alcohol stress in the mutant strain. Using linear correlation analysis it was found that “dancing bodies” index in the strains with unchanged phosphorus metabolism significantly correlated with PolyP1 fraction and viability. The number of cells with moving volutin granules in mutant strain correlates with EPPA and PolyP1 fraction. Using factor analysis, it was shown that “dancing bodies” index, PolyP1 fraction and viability were linked to each other in the strains of UCM Y-517 and CRY. In the mutant strain, the correlation between “dancing bodies” index, PolyP1 fraction and EPPA was found. **Conclusions.** Obtained data indicate that volutin granule motion of *S. cerevisiae* was connected with phosphorus metabolism and responded on the stress effects. We hypothesized the possible participation of vacuolar exopolyphosphatases in “dancing bodies” phenomenon.

Keywords: volutin granules, “dancing bodies”, exopolyphosphatase, polyphosphates, yeasts, stresses.

1. Kulaev IS, Vagabov VM, Kulakovskaya TV. [High-molecular-weight inorganic polyphosphates: biochemistry, cell biology, and biotechnology]. Moscow: Nauchnyi Mir; 2005. Russian.
2. Allan RA, Miller JJ. Influence of S-adenosylmethionine on DAPI-induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole. *Can J Microbiol.* 1980; 26(8):912-920.
3. Serafim LS, Lemos PC, Levantesi C, Tandoi V, Santos H, Reis MAM. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *J Microbiol Methods.* 2002; 51(1):1-18.
4. Tarayre C, Nguyen H-T, Brognaux A, Delepierre A, de Clercq L, Charlier R, Michels E, Meers E, Delvigne F. Characterization of phosphate accumulation organisms and techniques for polyphosphate detection: a review. *Sensors.* 2016; 16(6):797-811.
5. Barnett JA, Robinow CF. A history of research on yeasts 4: cytology part I, 1890-1950. *Yeast.* 2002;19(2):151-182.
6. Puchkov EO. Brownian motion of polyphosphate complexes in yeast vacuoles: characterization by fluorescence microscopy with image analysis. *Yeast.* 2010; 27(6):309-315.
7. Pick U, Weiss M. Polyphosphate hydrolysis within acidic vacuoles in response to amine-induced alkaline stress in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 1991; 97(3):1234-1240.
8. Ruiz FA, Rodrigues CO, Docampo R. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosome cruzi*. *J Biol Chem.* 2001; 276(28):26114-26121.
9. McGrath JW, Quinn JP. Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(9):4068-4073.
10. Mullan A, Quinn JP, McGrath JW. Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH condition. *Microb Ecol.* 2002; 44(1):67-77.
11. Qian Y, Borowski WI, Calhoon WD. Intracellular granule formation in response to oxidative stress in *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol.* 2011; 145(1):320-325.
12. Alcántara C, Blasco A, Zúñiga M, Monedero V. Accumulation of polyphosphate in *Lactobacillus spp.* and its involvement in stress resistance. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(5):1650-1659.
13. Weiss M, Bental M, Pick U. Hydrolysis of polyphosphates and permeability changes in response to osmotic shock in cells of the halotolerant alga *Dunaliella*. *Plant Physiol.* 1991; 97(3):1241-1248.
14. Klauth P, Pallerla SR, Vidaurre D, Ralfs C, Wendisch VF, Schoberth SM. Determination of soluble and granular inorganic polyphosphate in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 72(5):1099-1106.
15. Kjeldstad B, Johnsson A, Furuheim KM, Bergan SA, Krane J. Hyperthermia induced polyphosphate changes in *Propionibacterium acnes* as studied by ³¹P NMR. *Z Naturforsch C.* 1989; 44(1-2):45-48.
16. Jensen TE, Baxter M, Rachlin JW, Jani V. Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an x-ray energy dispersive study. *Environmental pollution Series A, Ecological and Biological.* 1982; 27(2):119-127.

17. Remonsellez F, Orell A, Jerez CA. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology*. 2006; 152(1):59-66.
18. Hovnanyan KO, Navasardyan LA, Hovnanyan MK, Trchounian AA. Ultrastructural analysis of volutin-acidocalciumosomes formation in some species of bacteria, spirochetes, yeast and protozoa during morphogenesis and under environment different factors action. *NAS RA Reports*. 2012; 112(1):118-126. Russian.
19. Smith IW, Wilkinson JF, Duguid JP. Volutin production in *Aerobacter aerogenes* due to nutrient imbalance. *J Bacteriol*. 1954; 68(4):450-463.
20. Racki LR, Tocheva EI, Dieterle MG, Sullivan MC, Jensen GJ, Newman DC. Polyphosphate granule biogenesis is temporally and functionally tied to cell cycle exist during starvation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*. 2017; 114(12):E2440-E2449.
21. Wurst H., Shiba T., Kornberg A. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1995; 177(4):898-906.
22. Sethuraman A, Rao NN, Kornberg A. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(15):8542-8547.
23. Pestov NA, Kulakovskaya TV, Kulaev IS. Effects of inactivation of the *PPN1* gene on exopolyphosphatases and function of mitochondria in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2005; 5(9):823-828.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72(1-2):248-254.
25. Trilisenko LV, Vagabov VM, Kulaev IS. [The content and chain length of polyphosphates from vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae* VKM Y-1173]. *Biochemistry (Mosc)*. 2002; 67(5):562-596. Russian.
26. Lichko LP, Kulakovskaya TV, Kulaev IS. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in different cell compartments of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)*. 2006; 71(11):1171-1175.
27. Collinson LP, Dawes IW. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J Gen Microbiol*. 1992; 138(2):329-335.
28. Koop H-U, Kiermayer O. Protoplasmic streaming in the giant unicellular green alga *Acetabularia mediterranea*. *Protoplasma*. 1980; 102(1-2):147-166.
29. Naito Y, Toh-e A, Hamaguchi H. *In vivo* time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cells. *J Raman Spectrosc*. 2005; 36(9):837-839.
30. Emrick D, Ravichandran A, Gosai J, Gordon DM, Smith L. The antifungal occidiofungin triggers an apoptotic mechanism of cell death in yeast. *J Nat Prod*. 2013; 76(5):829-838.
31. Lorenz B, Münkner J, Oliveira MP, Kuusksalu A, Leitão JM, Müller WE, Schröder HC. Changes in metabolism of inorganic polyphosphate in rat tissues and human cells during development and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1335(1-2):51-60.
32. Pertseva AD, Smirnov VF, Voronina OV. [Effect of extreme influences on the content of polyphosphates and polyphosphatase activity in micromycetes -destructors of polymer materials]. *Mikologiya i Fitopatologiya*. 2005; 39(1):53-58. Russian.
33. Andreeva N, Lichko L, Trilisenko L, Kulakovskiy IV, Kulakovskaya T. Yeast Polyphosphatases PPX1 and PPN1: Properties, Functions, and Localization. In: Kulakovskaya T,

- Pavlov E, Dedkova E, editors. Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells. Cham: Springer; 2016. p. 15-33.
34. Lichko LP, Eldarov MA, Dumina MV, Kulakovskaya TV. *PPX1* gene overexpression has no influence on polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)*. 2014; 79(11):1211-1215.
 35. Gerasimaitė R, Mayer A. Ppn2, a novel Zn²⁺-dependent polyphosphatase in the acidocalcisome-like yeast vacuole. *J Cell Sci*. 2017; 130(9):1625–1636.
 36. Shnol SE. [Physicochemical factors of biological evolution]. Moscow: Nauka; 1979. Russian.

Отримано 19.03.2018