

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПРИ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ПОЛИФОСФАТАЗЫ Ppx1

© 2023 г. Л. В. Трилисенко^а, А. Я. Валиахметов^а, Т. В. Кулаковская^а, *

^аФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: alla@ibpm.ru

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 25.03.2023 г.

Принята к публикации 25.03.2023 г.

Экзополифосфатаза Ppx1 дрожжей — конститутивный белок, локализованный преимущественно в цитоплазме. Очищенный фермент гидролизует неорганические полифосфаты с высокой активностью, но у нокаут-мутанта $\Delta ppx1$ *Saccharomyces cerevisiae* не выявлено изменений в физиологических свойствах. С целью выяснения функций этого фермента мы изучили физиологические особенности штамма *Saccharomyces cerevisiae*, сверхэкспрессирующего полифосфатазу Ppx1. При культивировании на среде YPD штамм не проявил особенностей роста по сравнению с родительским штаммом. В клетках *S. cerevisiae*, сверхэкспрессирующих полифосфатазу Ppx1, в стационарной фазе роста в 9 раз увеличился уровень АТФ, значительно снизилась активность вакуолярной АТФазы, увеличилась чувствительность к перекиси по сравнению с родительским штаммом. Уровень АФК при этом был почти вдвое выше, чем у родительского штамма, по степени окисленности липидов различий не наблюдали. Сверхэкспрессия Ppx1 в использованных условиях культивирования не повлияла на уровень полифосфатов, поэтому эти полимеры не являются регуляторами вышеописанных изменений. Известно, что реакции на окислительный стресс и активность вакуолярной АТФазы у дрожжей регулируются цАМФ, а Ppx1 способна к гидролизу этого сигнального соединения. Мы предполагаем, что одной из функций Ppx1 в клетках дрожжей является участие в регуляции уровня цАМФ. В связи с тем, что сверхэкспрессирующий Ppx1 штамм не отличался от родительского по содержанию неорганических полифосфатов, предположено, что наблюдаемые изменения обусловлены влиянием этого фермента на уровень цАМФ, который является его субстратом.

Ключевые слова: полифосфатаза, Ppx1, сверхэкспрессирующий штамм, АТФаза, окислительный стресс, АФК, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026365623600062, EDN: RJGLEN

Неорганические полифосфаты (полиР), линейные полимеры ортофосфорной кислоты, в большом количестве накапливаются в клетках дрожжей (Kulaev, Vagabov, 1983). ПолиР у дрожжей выполняют не только очевидную роль фосфорного и энергетического резерва (Kulaev, Vagabov, 1983), но и участвуют в регуляции клеточного цикла (Gerasimaitė et al., 2014), биогенезе и функционировании клеточной стенки (Калеева и соавт., 2008), а также в преодолении стрессов, в том числе вызванных токсическими концентрациями тяжелых металлов (Kulakovskaya, 2018). В связи с этим изучение роли ферментов метаболизма полиР у дрожжей представляет особый интерес для понимания механизмов приспособления этих эукариотических микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды. Среди четырех известных к настоящему времени ферментов, обладающих полифосфатазной активностью, экзопо-

лифосфатаза Ppx1 имеет наиболее давнюю историю изучения. Впервые этот фермент был очищен еще в 1990 г. (Андреева, Огороков, 1990), а вскоре был идентифицирован кодирующий его ген (Wurst et al., 1995). Близкими ортологами Ppx1 являются гены белки насекомых и млекопитающих, которые проявляют экзополифосфатазную активность и участвуют в процессах образования метастазов у млекопитающих (Tammenkoski et al., 2008). Физико-химические свойства (Андреева, Огороков 1990; Wurst et al., 1995) и механизм действия на полиР (Tammenkoski et al., 2007; Ugochukwu et al., 2007) для Ppx1 детально изучены. Фермент является экзополифосфатазой, т.е. отщепляет фосфат с конца цепи полиР по процессивному механизму (Wurst et al., 1995); он не гидролизует пиррофосфат, нуждается в ионах магния или кобальта для проявления активности (Андре-

ева, Окорочков, 1990) и локализован в основном в цитоплазме (Lichko et al., 2006).

Сведения о функции Ppx1 у дрожжей ограничены несколькими работами. У нокаут-мутантов *Δppx1 Candida albicans* наблюдали отсутствие инвазивного роста и снижение поверхностного filamentного роста (Jin et al., 2008). Клетки *C. albicans*, имеющие двойную нокаут-мутацию в генах *PPX1* и *PPN1*, кодирующих две различные полифосфатазы, проявляли нарушение устойчивости к ряду стрессов, в том числе к стрессу, вызывающему нарушение репликации ДНК, имели морфологические дефекты и сниженную вирулентность (Ahmed et al., 2022). Эти данные, вместе с указаниями на участие h-prune в метастазировании (Tammenkoski et al., 2008), свидетельствуют в пользу участия Ppx1 в процессах, связанных с цитоскелетом и системами клеточного движения.

Вопрос о функциях этого фермента у *S. cerevisiae* остается недостаточно ясным. Ppx1 является конститутивным белком (Wurst et al., 1995), однако в литературе нет сообщений о каких-либо дефектах роста нокаут-мутантов *Δppx1 S. cerevisiae*. В обычных условиях культивирования вклад этого фермента в метаболизм полиР сложно оценить: у нокаут-мутанта *Δppx1 S. cerevisiae* наблюдали только лишь небольшое увеличение содержания наиболее короткоцепочечной фракции полиР1, а содержание других фракций полиР не изменялось (Кулаковская и соавт., 2006). При культивировании в условиях лимитирования по фосфату рост и динамика потребления клеточных полиР у мутанта, лишенного Ppx1, не отличались от таковых у родительского штамма (Личко и соавт., 2008). В попытках понять функциональное значение Ppx1 у *S. cerevisiae* используют штаммы с более сложными генетическими конструкциями. Так, при изучении штамма дрожжей, у которого уровень и длина цепи вневакуолярных полиР были увеличены за счет экспрессии бактериальной полифосфаткиназы, наблюдали увеличение экспрессии ряда белков, вовлеченных в стрессовые ответы, в том числе Hog1 и Yak1 киназ и факторов транскрипции Msn2/Msn4. Этот эффект усиливался при внесении дополнительной нокаут-мутации в ген *PPX1*, что указывает на важную роль Ppx1 в регуляции уровня вневакуолярных полиР (McCarthy et al., 2022).

Еще одним экспериментальным подходом для выяснения функций полифосфатаз является изучение штаммов дрожжей, сверхпродуцирующих эти ферменты. Так, был получен штамм *S. cerevisiae*, содержащий полноразмерный ген *PPX1* в составе экспрессионного вектора pMB1 с “каскадной экспрессией”, состоявшей из сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*PGK1*) и терминатора фосфоглицерат киназы (*TDH*) *S. cerevisiae* (Личко и соавт.,

2014). У этого штамма, сверхэкспрессирующего Ppx1, не было обнаружено существенных изменений в уровне полиР (Личко и соавт., 2014).

Целью данной работы было оценить изменения в физиологическом состоянии клеток штамма-сверхпродуцента Ppx1 *S. cerevisiae*, не связанные непосредственно с обменом полиР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе были использованы штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: штамм CRN (*MATa ade2 his3 ura3 ppn1D::CgTRP1*), нокаут-мутант по гену *PPN1*, кодирующего полифосфатазу Ppn1 (Sethuraman et al., 2001) и полученный на его основе трансформант CRN/PPX1, сверхпродуцент полифосфатазы Ppx1 (Личко и соавт., 2014).

Состав среды и условия культивирования. Культуру дрожжей CRN поддерживали на YPD (2% пептона, 1% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы) агаризованной среде (2% агар), штамм CRN/PPX1 — на агаризованной селективной среде YNB (“Difco”, США) без урацила (Личко и соавт., 2014). Инокулят и клетки для экспериментов выращивали в жидкой среде YPD, содержащей 14 мМ KH_2PO_4 . Инокулят вносили в среду до оптической плотности 0.08–0.09 ед. Культивирование проводили в колбах с 200 мл среды на качалках при 29°C и перемешивании со скоростью 145 об./мин. Для построения кривой роста штаммов через определенные промежутки времени отбирали аликвоты культур и измеряли оптическую плотность при $\lambda = 530$ нм в кювете шириной 3.07 мм на фотометре КФК-3 (ПО “ЗОМЗ”, Россия).

Сбор биомассы. Биомассу собирали на стационарной стадии роста (24 ч) центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, трижды промывая холодной дистиллированной водой, взвешивали, замораживали при –20°C и использовали для анализа неорганических полифосфатов.

Определение АТФ. Для измерения уровня АТФ промытые и взвешенные образцы биомассы суспендировали в дистиллированной воде до определенного объема, отбирали аликвоты суспензии, содержавшие по 100 мг сырой биомассы и осаждали клетки центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Для экстракции АТФ к осадку добавляли 320 мкл диметилсульфоксида (DMSO) (“Sigma”, США), суспендировали и хранили при –20°C. В полученных экстрактах АТФ определяли стандартным методом с использованием препарата люциферин-люциферазы (“Sigma”, США). Измерение люминесценции проводили на люцинометре 1250 (“ЛКВ”, Швеция).

Определение глюкозы. Для определения концентрации глюкозы в среде культивирования отбирали по 0.5 мл культуральной жидкости. Клет-

ки удаляли центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Глюкозу в супернатанте определяли с помощью стандартного набора реагентов Глюкоза ДДС (АО “Диакон-ДС”, Россия). Измерение проводили в планшетах при 500 нм на планшетном фотометре “Эфос 9305” (Россия).

Экстракция полиР. ПолиР экстрагировали из образцов биомассы согласно методике, описанной ранее (Личко и соавт., 2014). К 1 г замороженных клеток добавляли 9 мл 0.5 М HClO_4 и 1 мл 1 М HClO_4 , клетки суспендировали. Полифосфаты экстрагировали в течение 15 мин при 0°C и постоянном перемешивании. Клетки осаждали при 3000 g. Операцию повторяли дважды, супернатанты объединяли. Полученный экстракт содержал кислоторастворимую фракцию полиР (полиРI). К осадку клеток добавляли снова 9 мл 0.5 М HClO_4 и 1 мл 1 М HClO_4 , суспендировали и экстрагировали полиР в течение 20 мин при 90°C, периодически помешивая. После охлаждения клетки осаждали при 3000 g. Операцию повторяли дважды, супернатанты объединяли. Полученный экстракт содержал кислотонерастворимую фракцию полиР (полиРII). Количество фосфора во фракциях определяли по освободившемуся ортофосфату после 10-ти минутного гидролиза аликвоты фракции в 1 М HCl на кипящей бане. Ортофосфат определяли по методу Хейнонена и Лаhti (Heinonen, Lahti, 1981).

Определение АТФазной активности. АТФазную активность определяли после пермеабилзации клеток путем замораживания—оттаивания в присутствии тритона X-100 (Miozzari et al., 1978). 0.5 г клеток суспендировали в 10 мл 10 мМ MES (морфолиноэтансульфоновая кислота)—NaOH буфере, pH 6.5, содержащем 10% сорбит, 100 мМ KCl и 4 мМ MgSO_4 , затем добавляли 0.5 мл 1% тритона X-100 и немедленно замораживали при -80°C . После оттаивания во льду клетки отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин и дважды промывали тем же буфером. Затем суспендировали осадок клеток в 2 мл этого же буфера и использовали полученную суспензию для определения АТФазной активности. Инкубационная среда содержала образцы клеток, 5 мМ АТФ, 5 мМ MgSO_4 и буферные растворы в соответствии с оптимумами pH для трех основных АТФаз дрожжей: 20 мМ MES—NaOH — буфер, pH 6.5 для АТФазы цитоплазматической мембраны, 50 мМ *Трис*-HCl, pH 7.0 для АТФазы вакуолярной мембраны и 50 мМ *Трис*-HCl, pH 8.5 для АТФазы митохондрий. Для оценки активности этих АТФаз использовали специфические ингибиторы: 100 мкМ $\text{Na}_2\text{VO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ как ингибитор АТФазы цитоплазматической мембраны (Borst-Pauwels, Peters, 1981); 0.5 мкМ бафиломицин А (“Sigma-Aldrich”, США) как ингибитор АТФазы вакуолярной мембраны (Bowman et al., 1988) и 5 мМ NaN_3 как ингибитор

АТФазы митохондрий (Harris, 1989). Реакцию гидролиза АТФ во всех трех случаях проводили при 30°C. Вклад каждой из АТФаз оценивали по разнице в количестве выделившегося фосфата между инкубацией в отсутствие и в присутствии ингибиторов. Фосфат определяли колориметрическим методом с использованием красителя малахитового зеленого (Andreeva et al., 2019).

Определение полифосфатазной активности в бесклеточной экстракте. Бесклеточный экстракт получали и полифосфатазную активность определяли с субстратом полиР со средней длиной цепи 188 фосфатных остатков (“Monsanto”, США) в присутствии 2.5 мМ MgSO_4 , как описано ранее (Личко и соавт., 2014).

Определение чувствительности к перекиси. Изучение зависимости роста штаммов от концентрации H_2O_2 проводили в планшетах для иммуноанализа в среде YPD, содержащей от 1 до 5 мМ H_2O_2 . Исходная оптическая плотность культур составляла 0.03–0.04 ед. Клетки культивировали при 30°C в течение 22 ч (стационарная стадия) на термошейкере при 600 об./мин. Оптическую плотность измеряли при 594 нм на планшетном фотометре (“Эфос 9305”, Россия).

Определение активных форм кислорода (АФК) и уровня окисленности липидов (ПОЛ) методом проточной цитометрии. Для определения АФК проводили подсчет количества клеток, в которых 1,2,3-дигидрородамин (DHR) (“Sigma”, США) окислен АФК до флуоресцентной формы (1,2,3-родамин). Для этого к 0.1 мл культуры добавляли 0.002 мл 0.05% раствора DHR в DMSO. Суспензию инкубировали 1 ч при 30°C. Клетки осаждали 1 мин на микроцентрифуге при 18000 об./мин, супернатант декантировали и осадок ресуспендировали в 0.850 мл воды MilliQ. 100000 клеток подсчитывали на цитометре NovoCyte (“Agilent”, США), используя длины волн 488 и 533 нм, соответственно, для возбуждения и эмиссии флуоресценции.

Для оценки уровня окисленности липидов проводили подсчет количества клеток, окрашенных с помощью набора BODIPY (image-ITTM Lipid Peroxidation Kit) (“Invitrogen”, США). Для этого к 0.1 мл культуры добавляли 0.001 мл 2 мМ раствора BODIPY в DMSO. Клетки инкубировали 1 ч при 30°C, осаждали и дважды промывали 0.15 мл воды MilliQ. Осадки суспендировали в 0.1 мл воды MilliQ. 100000 клеток подсчитывали на цитометре NovoCyte (“Agilent”, США). Для возбуждения флуоресценции использовали длину волны 488 нм, для эмиссии — 533 (окисленные липиды) и 585 нм (неокисленные липиды).

Все эксперименты повторяли трижды, статистическую обработку проводили с помощью стандартной программы Excel.

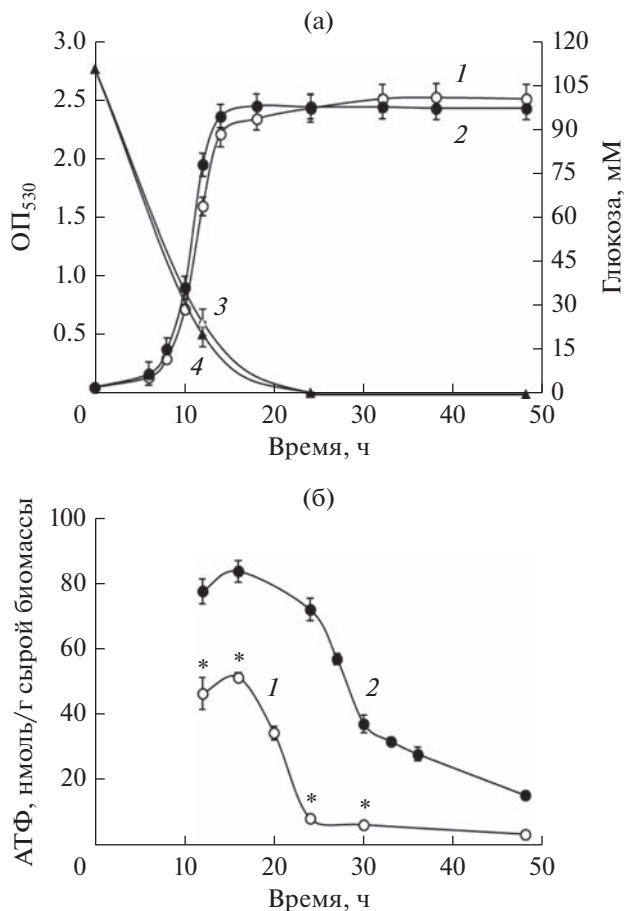


Рис. 1. (а) — Оптическая плотность культур штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2) и концентрация глюкозы в среде YPD в процессе культивирования штаммов CRN (3) и CRN/PPX1 (4) в среде YPD. (б) — Уровень АТФ в клетках штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2) в процессе культивирования в среде YPD. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма CRN с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: для данных на рис. 1а разница является статистически незначимой; для данных рис. 1б: * — $p < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании в среде YPD кривые роста родительского штамма CRN и штамма CRN/PPX1, сверхэкспрессирующего Ppx1, были одинаковыми (рис. 1а). Полифосфатазная активность в бесклеточном экстракте штаммов CRN и CRN/PPX1 составила 0.3 и 8.0 Е на 1 мг белка соответственно. У обоих штаммов в стационарной стадии роста (24 ч) было определено содержание полиР в клетках при выращивании в среде YPD с избытком фосфата (14 мМ). Различий в содержании ортофосфата, кислоторастворимых и кислотонерастворимых полиР не обнаружено (рис. 2), также как показано ранее (Личко с соавт., 2014).

Неожиданной особенностью штамма CRN/PPX1 был более высокий уровень АТФ,

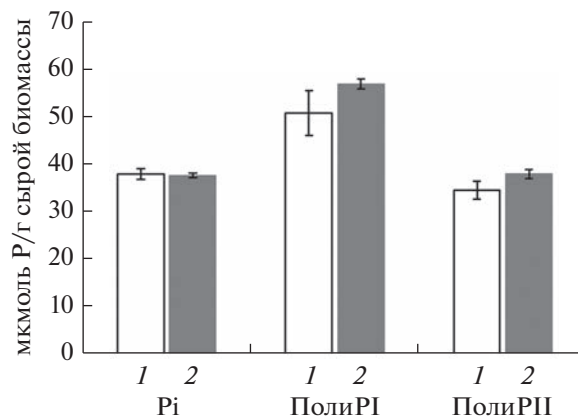


Рис. 2. Содержание Pi, кислоторастворимых полиР (полиРI) и кислотонерастворимых полиР (полиРII) в клетках штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2) в стационарной фазе роста. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма CRN с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel, разница является статистически незначимой.

причем на стационарной стадии роста уровень АТФ в клетках штамма CRN/PPX1 превышал уровень АТФ в клетках родительского штамма в 9 раз. При этом различия в динамике потребления глюкозы между штаммами не обнаружено (рис. 1б). Следовательно, высокий уровень АТФ в клетках штамма CRN/PPX1 на стационарной стадии роста мог быть связан со снижением ее расходования. Самыми активными потребителями АТФ на стационарной стадии роста, когда этот компонент мало расходуется на анаболические процессы, должны быть протонные АТФазы. Мы проверили активность трех основных АТФаз у обоих штаммов и обнаружили, что активности АТФаз митохондрий и цитоплазматической мембраны не различались, тогда как активность АТФазы вакуолярной мембраны у штамма CRN/PPX1 была в 5 раз ниже, чем у родительского штамма (рис. 3). Поскольку это достаточно активный протонный насос, то такое значительное снижение его активности вполне достаточно для объяснения увеличения содержания АТФ.

Штамм CRN/PPX1 был более чувствительным к перекиси водорода по сравнению с родительским штаммом (рис. 4). Концентрация перекиси, ингибирующая рост на 50% CRN/PPX1 и CRN, составила ~1.4 и 2.3 мМ соответственно (рис. 4). Этот эффект не зависел от стадии роста клеток, которые использовали для засева в планшеты (рис. 4а, 4б). Напомним, что уровень АТФ в логарифмической стадии роста в клетках штамма CRN/PPX1 был выше, чем у родительского штамма всего лишь в полтора раза, тогда как в стационарной стадии это различие было более значительным (рис. 1б). Следовательно, не прослеживается

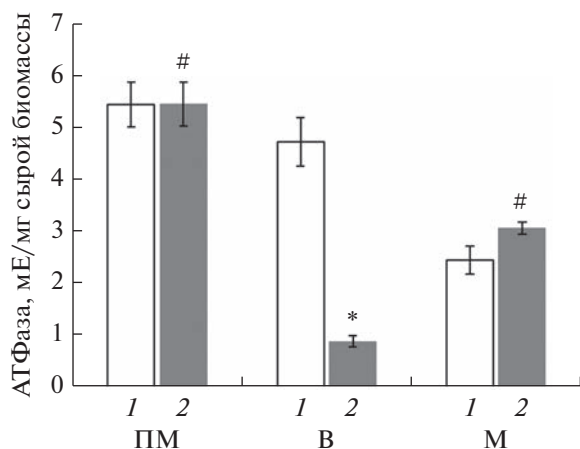


Рис. 3. Активность АТФаз при определении в пермеабелизованных клетках штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2) на стационарной стадии роста; ПМ – АТФаза плазматической мембраны, В – АТФаза вакуолярной мембраны, М – АТФаза митохондрий. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма CRN с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: * – $p < 0.01$; # – разница статистически незначима.

взаимосвязь между различиями в чувствительности к перекиси и уровне АТФ.

Мы предположили, что клетки штамма CRN/PPX1 имеют больший уровень активных форм кислорода (АФК) в контрольных условиях роста по сравнению с родительским штаммом. Культивирование в присутствии перекиси усиливает процессы перекисидации в клетке, что могло бы приводить к ингибированию роста при более низких концентрациях перекиси. Было обнаружено, что уровень АФК в клетках стационарной стадии у штамма CRN/PPX1 почти в 2 раза выше, чем у CRN (рис. 5а). Однако статистически достоверной разницы в степени окисленности липидов между штаммами не наблюдали (рис. 5б).

Итак, в клетках *S. cerevisiae*, сверхэкспрессирующих полифосфатазу Ppx1, наблюдали следующие физиологические изменения на стационарной стадии роста: в 9 раз увеличился уровень АТФ, значительно снизилась активность вакуолярной АТФазы, увеличилась чувствительность к перекиси по сравнению с родительским штаммом. Уровень АФК при этом был выше, чем у родительского штамма. Поскольку сверхэкспрессия PPX1 в наших экспериментальных условиях не повлияла на уровень полиР, то сами полиР мы не рассматриваем в данном случае в роли сигнальных молекул, регулирующих эти изменения. Возникает предположение, что триггером этих изменений являются другие сигнальные соединения дрожжей, содержащие фосфоэфирную связь. Ppx1 гидролизует аденозин 5'-тетрафосфат и гуанозин 5'-тетрафосфат до

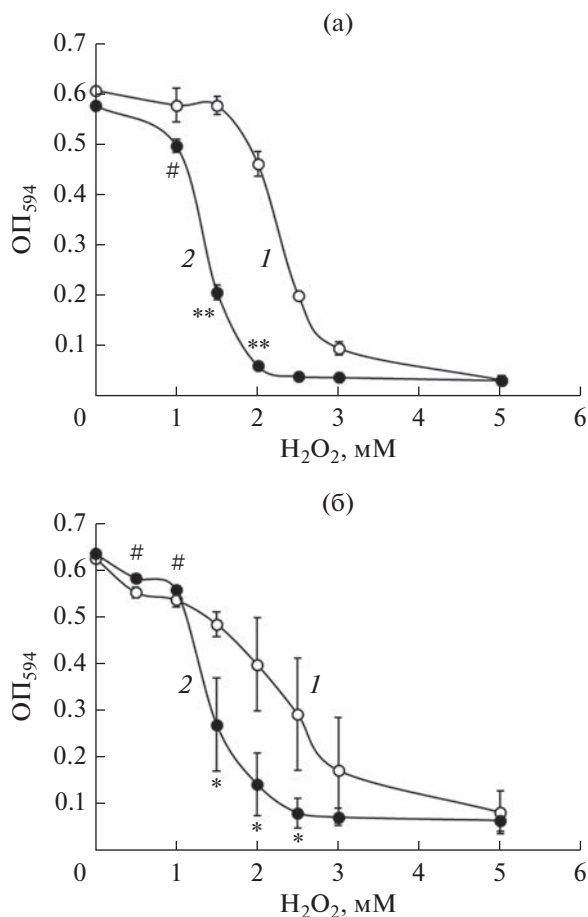


Рис. 4. Оптическая плотность культур в стационарной стадии при культивировании в иммунопланшетах в среде YPD с разной концентрацией H₂O₂: (а) – для засева использовали клетки, выращенные в течение 24 ч; (б) – для засева использовали клетки, выращенные в течение 11 ч. (1) – штамм CRN, (2) – штамм CRN/PPX1. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма CRN с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: ** – $p < 0.001$; * – $p < 0.01$; # – разница статистически незначима.

АТФ и ГТФ соответственно (Andreeva et al., 2019), но сведения о сигнальной роли этих соединений немногочисленны (Jakubowski, 1986). Фермент не способен к гидролизу хорошо известного сигнального соединения, инозитол пирогосфата (Lonetti et al., 2011), однако гидролизует цАМФ до АМФ *in vitro* (Andreeva et al., 2019). У дрожжей множество сигналов, связанных с ростом и стрессовыми условиями, изменяют уровень цАМФ, повышение которого приводит к увеличению активности протеинкиназы А (РКА), а этот фермент, в свою очередь, регулирует широкий спектр клеточных процессов (Portela, Rossi 2020). В частности, протеинкиназа А участвует в реакциях клеток дрожжей на окислительный стресс (Roger et al., 2020). V-АТФаза вакуолярной мембраны находится на

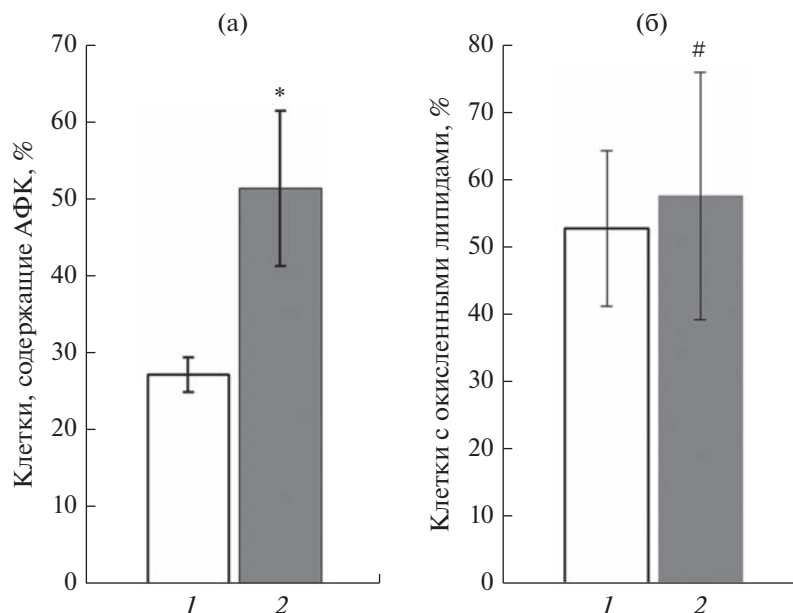


Рис. 5. Оценка уровня АФК (а) и окисленности липидов (б) в клетках штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2). Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: * – $p < 0.01$; # – разница статистически незначима.

пересечении различных внутриклеточных сигнальных путей, а ее сложная многосубъединичная структура претерпевает обратимую сборку и разборку в зависимости от условий среды (Parga et al., 2014). Процесс разборки стимулируется при снижении концентрации глюкозы в среде (Parga et al., 2014), а также в условиях окислительного стресса (Khan et al., 2021). Этот процесс зависит, в том числе, от пути Рас/цАМФ/РКА (Ras/cAMP/РКА pathway). Снижение уровня цАМФ может приводить к преобладанию процесса разборки фермента и, соответственно, снижению активности V-АТФазы (Bond, Forgacs 2008).

Наблюдаемое в данной работе снижение активности V-АТФазы и способности клеток дрожжей к преодолению окислительного стресса свидетельствуют в пользу того, что сверхэкспрессия Ppx1 приводит к нарушению увеличения уровня цАМФ при стрессах за счет его недостаточно контролируемого гидролиза. Эти данные позволяют предположить, что одной из функций Ppx1 в клетках дрожжей является участие в регуляции уровня цАМФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Н.А., Окорочков Л.А. Некоторые свойства высокоочищенной полифосфатазы клеточной оболочки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 2286–2292.
- Andreeva N.A., Okorokov L.A., Kulaev I.S. Purification and certain properties of cell envelope polyphosphatase of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* // Biochemistry (Moscow). 1990. V. 55. P. 819–826.
- Калебина Т.С., Егоров С.Н., Арбатский Н.П., Безсонов Е.Е., Горковский А.А., Кулаев И.С. О роли высокомолекулярных полифосфатов в активации глюкантрансферазы Bgl2p из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // ДАН. 2008. Т. 420. С. 695–699.
- Kalebina T.S., Egorov S.N., Arbatskii N.P., Bezsonov E.E., Gorkovskii A.A., Kulaev I.S. The role of high-molecular-weight polyphosphates in activation of glucan transferase Bgl2p from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall // Dokl. Biochem. Biophys. 2008. V. 420. P. 142–145.
- Кулаковская Т.В., Трилисенко Л.В., Личко Л.П., Вагабов В.М., Кулаев И.С. Влияние инактивации генов экзополифосфатазы Ppx1 и Ppn1 на содержание полифосфатов различных фракций у *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 35–39.
- Kulakovskaya T.V., Trilisenko L.V., Lichko L.P., Vagabov V.M., Kulaev I.S. The effect of inactivation of the exo- and endopolyphosphatase genes Ppx1 and Ppn1 on the level of different polyphosphates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 25–28.
- Личко Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаковская Е.В., Кулаев И.С. Инактивация генов Ppx1 и Ppn1, кодирующих экзополифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* не препятствует использованию полифосфатов в каче-

- стве фосфорных резервов // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 1224–1229.
- Lichko L.P., Kulakovskaya T.V., Kulakovskaya E.V., Kulaev I.S. Inactivation of *PPX1* and *PPN1* genes encoding exopolyphosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* does not prevent utilization of polyphosphates as phosphate reserve // Biochemistry (Moscow). 2008. V. 73. P. 985–989.
- Личко Л.П., Эльдаров М.А., Думина М.В., Кулаковская Т.В. Сверхэкспрессия гена *PPX1* не влияет на полифосфаты *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. 2014. Т. 79. С. 1487–1492.
- Lichko L.P., Eldarov M.A., Dumina M.V., Kulakovskaya T.V. *PPX1* gene overexpression has no influence on polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. P. 1211–1215.
- Ahmed Y., Ikeh M.A.C., MacCallum D.M., Day A.M., Waldron K., Quinn J. Blocking polyphosphate mobilization inhibits pho4 activation and virulence in the pathogen *Candida albicans* // mBio. 2022. V. 13. Art. e0034222. <https://doi.org/10.1128/mbio.00342-22>
- Andreeva N., Ledova L., Ryazanova L., Tomashevsky A., Kulakovskaya T., Eldarov M. Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases // Biochimie. 2019. V. 163. P. 101–107.
- Bond S., Forgac M. The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar (H^+)-ATPase in yeast // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 36513–36521.
- Borst-Pauwels G.W., Peters P.H. Factors affecting the inhibition of yeast plasma membrane ATPase by vanadate // Biochim. Biophys. Acta. 1981. V. 642. P. 173–181.
- Bowman E.J., Siebers A., Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 7972–7976.
- Harris D.A. Azide as a probe of co-operative interactions in the mitochondrial F1-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 974. P. 156–162.
- Heinonen J.K., Lahti R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase // Anal. Biochem. 1981. V. 113. P. 313–317.
- Gerasimaitė R., Sharma S., Desfougères Y., Schmidt A., Mayer A. Coupled synthesis and translocation restrains polyphosphate to acidocalcisome-like vacuoles and prevents its toxicity // J. Cell. Sci. 2014. V. 127. P. 5093–5104.
- Jakubowski H. Sporulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by synthesis of adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2378–2382.
- Jin R., Dobry C.J., McCown P.J., Kumar A. Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression // Mol. Biol. Cell. 2008. V. 19. P. 284–296.
- Khan M.M., Lee S., Couoh-Cardel S., Oot R.A., Kim H., Wilkens S., Roh S.H. Oxidative stress protein Oxl1 promotes V-ATPase holoenzyme disassembly in catalytic activity-independent manner // EMBO J. 2022. V. 41. Art. e109360. <https://doi.org/10.15252/embj.2021109360>
- Kulaev I.S., Vagabov V.M. Polyphosphate metabolism in microorganisms // Adv. Microbiol. Physiol. 1983. V. 24. P. 83–171.
- Kulakovskaya T. Inorganic polyphosphates and heavy metal resistance in microorganisms // World J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 34. Art. 139. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2523-7>
- 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. V. 26. P. 45–54.
- Lonetti A., Szijgyarto Z., Bosch D., Loss O., Azevedo C., Sa- iardi A. Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 31966–31974.
- McCarthy L., Abramchuk I., Wafy G., Denoncourt A., Lavallée-Adam M., Downey M. Ddp1 cooperates with Ppx1 to counter a stress response initiated by nonvacuolar polyphosphate // mBio. 2022. V. 13. Art. e0039022. <https://doi.org/10.1128/mbio.00390-22>
- Miozzari G.F., Niederberger P., Hutter R. Permeabilization of microorganisms by Triton X-100 // Anal. Biochem. 1978. V. 90. P. 220–233.
- Parra K.J., Chan C.Y., Chen J. *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H^+ -ATPase regulation by disassembly and reassembly: one structure and multiple signals // Eukaryot. Cell. 2014. V. 13. P. 706–714.
- Portela P., Rossi S. cAMP-PKA signal transduction specificity in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet. 2020. V. 66. P. 1093–1099. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01107-6>
- Roger F., Picazo C., Reiter W., Libiad M., Asami C., Hanzén S., Gao C., Lagniel G., Welkenhuysen N., Labarre J., Nyström T., Grotli M., Hartl M., Toledano M.B., Molin M. Peroxiredoxin promotes longevity and H_2O_2 -resistance in yeast through redox-modulation of protein kinase A // Elife. 2020. V. 9. Art. e60346. <https://doi.org/10.7554/eLife.60346>
- Sethuraman A., Rao N.N., Kornberg A. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 8542–8547.
- Tammenkoski M., Moiseev V.M., Lahti M., Ugochukwu E., Brondijk T.H.C., White S.A., Lahti R., Baykov A.A. Kinetic and mutational analyses of the major cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 9302–9311.
- Tammenkoski M., Koivula K., Cusanelli E., Zollo M., Steegborn C., Baykov A.A., Lahti R. Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 9707–9713.
- Ugochukwu E., Lovering A.L., Mather O.C., Young T.W., White S.A. The crystal structure of the cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the basis for substrate specificity // J. Mol. Biol. 2007. V. 371. P. 1007–1021.
- Wurst H., Shiba T., Kornberg A. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 898–906.

Physiological Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* Strain Overexpressing Polyphosphatase Ppx1

L. V. Trilisenko¹, A. Ya. Valiakhmetov¹, and T. V. Kulakovskaya¹, *

¹Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: alla@ibpm.ru

Received February 16, 2023; revised March 25, 2023; accepted March 25, 2023

Abstract—The Ppx1 exopolyphosphatase of yeast is a constitutive protein localized predominantly in the cytoplasm. The purified enzyme hydrolyzes inorganic polyphosphates with high activity; however, in the knockout $\Delta ppx1$ mutant of *Saccharomyces cerevisiae* the increase in the polyphosphate level was small, and no changes in physiological properties of this mutant were observed. To elucidate the functions of Ppx1, we studied the physiological characteristics of the *S. cerevisiae* strain overexpressing this enzyme. When cultivated in the YPD medium, the strain overexpressing Ppx1 showed no growth features different from those of the parental strain. The following physiological features of the strain overexpressing Ppx1 were observed at the stationary stage of growth: the level of ATP increased by nine times, the activity of vacuolar ATPase significantly decreased, and the sensitivity to peroxide increased compared to the parental strain. The level of reactive oxygen species doubled, while the degree of lipid oxidation remained the same as in parental strain. Since overexpression of Ppx1 under the culture conditions used did not affect the polyphosphate level, these polymers were not the regulators of the changes described above. Response to oxidative stress and vacuolar ATPase activity in yeasts is known to be regulated by cAMP, while Ppx1 is capable of hydrolyzing this signaling compound. We suggest that one of the functions of Ppx1 in yeasts is participation in the regulation of cAMP level.

Keywords: polyphosphatase, Ppx1, overexpressing strain, ATPase, oxidative stress, reactive oxygen species, *Saccharomyces cerevisiae*