

На правах рукописи

ТРИЛИСЕНКО ЛЮДМИЛА ВАСИЛЬЕВНА

**ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И МЕТАБОЛИЗМА
ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛИФОСФАТОВ
У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Пушино, 2005



Работа выполнена в Лаборатории регуляции биохимических процессов
Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

Научные руководители:

член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук,
профессор И.С. Кулаев;

доктор биологических наук,
В.М. Вагабов.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор М.С. Крицкий;

кандидат биологических наук,
В.Н. Хмеленина.

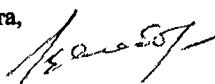
Ведущая организация: НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

Защита состоится « 2 » декабря 2005 г. в 14 час 00 мин на заседании
Диссертационного совета Д 002.121.01 в Институте биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН по адресу: 142290, г. Пущино
Московской области, проспект Науки, д. 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии и
физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

Автореферат разослан « 28 » октября 2005 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

 В.М. Вагабов

2006-4
22895

2219865

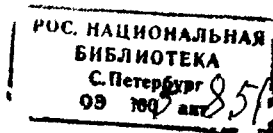
- 1 -

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Фосфор, входящий в состав многих важных клеточных компонентов, в том числе нуклеотидов, нуклеиновых кислот, фосфолипидов и других соединений, абсолютно необходим для жизнедеятельности клеток. Неорганические полифосфаты (полиР) - полимеры, состоящие из остатков ортофосфорной кислоты, соединенных между собой макроэргическими фосфоангидридными связями, при гидролизе которых высвобождается энергия примерно такая же, как и при отщеплении терминального фосфата от АТФ. Благодаря этому, полиР являются запасниками фосфора и энергии. Они также выполняют другие многочисленные функции: участвуют в связывании катионов, обеспечивая внутриклеточный ионный баланс (Oshumi and Anraku, 1981; Lichko et al., 1982), в формировании и функционировании клеточной оболочки (Вагабов и др., 1990; Иванов и др., 1996), в регуляции активности ряда ферментов (Wolska-Mitaszko, 1997; Кулаев и др., 1999), в преодолении осмотического и щелочного стрессов, температурного шока (Greenfield et al., 1987; Castro et al., 1997), в формировании специальных каналов, транспортирующих некоторые ионы через клеточные мембраны (Рош, 2000) и др. Все это выдвигает исследования путей метаболизма неорганических полифосфатов в ряд актуальных задач биохимии и клеточной биологии.

В зависимости от компартиментации и состояния в клетке полиР экстракцией можно разделить на несколько фракций, функции которых определяются компартиментом, с которым связаны эти соединения. Однако о динамике и структуре фракций полиР в процессе роста клеток в литературе имеются фрагментарные данные. Они касаются, в основном, общего содержания полиР в клетке или в отдельной органелле (Liss and Langen, 1962; Greenfield et al., 1987; Beauvoit et al., 1989). Количественное содержание фракций является результатом двух противоположных процессов - синтеза и деградации полиР. Пути синтеза полиР у дрожжей, в отличие от бактерий, до сих пор остаются неясными. Доказан только путь сопряженного синтеза фракции высокомолекулярных полиР, локализованной в клеточной оболочке, и маннопротеина клеточной стенки, который обеспечивает образование части общего пула полиР в клетке (Кулаев, Вагабов, and Шабалин, 1987). Одним из подходов к пониманию путей биосинтеза полиР может быть изучение влияния метаболических ингибиторов на биосинтез отдельных фракций этих полимеров. Имеющиеся сообщения касаются суммарного количества полиР в целых клетках и их содержания в митохондриях дрожжей (Beauvoit et al., 1991; Loureiro-Dias and Santos 1989; Pestov et al., 2003).

Экзополифосфатазы, участвующие в деградации полиР, обнаружены почти во всех клеточных структурах дрожжей и имеют определенную специфичность по отношению к длине субстрата. (Lichko et al., 2003a). Однако, механизмы вовлечения полиР в метаболизм с участием этих ферментов пока не известны. Изучение структуры и метаболизма отдельных фракций полиР у дрожжей



обусловлено необходимостью выяснения путей биосинтеза и функций полиР, локализованных в клеточных органеллах, что позволит, в конечном итоге, более полно представить картину обмена этих необычных полианионов.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение структуры и содержания отдельных фракций полифосфатов в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в зависимости от фазы роста, условий культивирования, а также мутаций по основным генам полифосфатного обмена.

Исходя из поставленной цели, было необходимо решить следующие задачи:

- 1) подобрать оптимальный метод экстракции фракций полиР из дрожжей, позволяющий осуществлять более полное и дробное извлечение их из клеток, и определить структуру фракций методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии;
- 2) определить содержание и структуру фракций полиР на разных фазах роста культуры дрожжей, а также в процессе фосфорного голодания и последующего сверхсинтеза полиР;
- 3) определить длину цепи и содержание полиР в вакуолях в обычных условиях роста дрожжей и в условиях сверхсинтеза полиР;
- 4) изучить влияние ингибиторов различных биохимических процессов на синтез фракций полиР;
- 5) изучить содержание отдельных фракций полиР у мутантов *S. cerevisiae* с инактивированными генами экзополифосфатазы PPX1 и эндополифосфатазы PPN1.

Научная новизна работы. Установлено, что в процессе роста *S. cerevisiae* ВКМ Y-1173 каждая фракция полиР характеризуется своей динамикой накопления и потребления. Сочетанием химической экстракции полиР из клеток и метода ^{31}P -ЯМР впервые показано, что средняя длина цепи разных фракций не является константной величиной, а изменяется в процессе роста и в зависимости от условий культивирования дрожжей.

Впервые выявлен ступенчатый характер синтеза щелочерастворимых полифосфатов, когда после фосфорного голодания на первом этапе происходит накопление полифосфатов, а на следующем – только увеличение длины их цепи.

Обнаружено, что полифосфаты вакуолей и щелочерастворимой фракции полиР4, в отличие от других фракций этих соединений, не подвержены сверхнакоплению, что свидетельствует о существовании различных механизмов регуляции синтеза полиР в клетках дрожжей.

Установлено, что ингибиторы биохимических процессов по-разному влияют на синтез отдельных фракций полифосфатов, в частности, ЦЦИ и FCCP полностью подавляют накопление фракции полиР4, а 2-дезоксиглюкоза – фракции полиР3.

С помощью мутантов с инактивированными генами, кодирующими экзополифосфатазу цитозоля PPX1 и эндополифосфатазу вакуолей PPN1, впервые выявлена метаболическая связь между содержанием

кислоторастворимой фракции полиР1 и уровнем экзополифосфатазной активности цитозоля у дрожжей.

Совокупность полученных данных дает основания выдвинуть гипотезу о множественности путей биосинтеза отдельных фракций полифосфатов у дрожжей *S. cerevisiae*.

Научно-практическое значение. Данная работа является фундаментальным исследованием. Полученные результаты систематизируют и расширяют представления о структуре и метаболизме фракций полиР у дрожжей, в частности, в условиях фосфорного голодания и последующем их сверхсинтезе, при воздействии ингибиторов, а также влияние на их уровень мутаций по основным генам полифосфатного обмена. Материалы работы могут быть использованы в лекциях и практических занятиях студентов по биохимии микроорганизмов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 114 страницах, содержит 15 таблиц и 14 рисунков. Библиографический указатель включает 211 источников литературы.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях, в том числе, "Биосинтез и деградация микробных полимеров. Фундаментальные и прикладные аспекты" (Пушино, 1995), 8th International conference on phosphorus chemistry (Jerusalem, Israel, 1995), 2-й съезд Российского биохимического общества (Москва, 1997), «Modern problem of microbiol biochemistry and biotechnology» (Pushchino, 2000). По материалам диссертации опубликовано шесть статей в журналах: «Биохимия», «Микробиология», «Молекулярная биология», «Process Biochemistry».

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Объект исследования. Объектом исследования в данной работе были следующие штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: ВКМ У-1173, а также полученные из лаборатории А. Корнберга (Стенфордский университет, США) родительский штамм CRУ и его мутанты с инактивированными генами экзо- и эндополифосфатаз – CRХ, CRN и CNX.

Среда и условия культивирования. Штамм ВКМ У-1173 выращивали на синтетической среде Ридер (Reader, 1927), включающей неорганические соли, 0,2% дрожжевой экстракт, 2% глюкозу в качестве источника углерода и содержащей 9 мМ ортофосфат (Р_i) (полноценная среда, «+Р»). Для создания условий гиперкомпенсации полиР использовали среду без фосфата («-Р»), заменяя его эквивалентным количеством КСl, и без дрожжевого экстракта (из-за присутствия в нем Р_i), внося дополнительно инозит (2 мг/л). В экспериментах по изучению влияния ингибиторов на накопление полиР у дрожжей полноценная среда Ридер содержала 18,3 мМ Р_i, а фосфат дефицитная – 1,3 мМ

P_i. Штаммы CRY, CRX, CRN и CNX, являющиеся ауксотрофами, выращивали на среде YPD, состоящей из 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона и 2% глюкозы (Sethuraman et al., 2001). Культивирование дрожжей проводили в колбах с 200 мл среды на качалке (120 об/мин) при 29°C.

Выделение вакуолей. Сферопласты из целых клеток получали с использованием «улиточного фермента», как описано ранее (Андреева и др., 1993). Полученные сферопласты разрушали в изотонических условиях (1 М сорбит в 10 мМ цитратном буфере, pH 6,8) в гомогенизаторе Поттера. Неразрушенные сферопласты осаждали из раствора 1 М сахарозы и 1 М сорбита (1,5:1) центрифугированием при 1800 g в течение 15 мин. К супернатанту добавляли 1 М сорбит до соотношения сахарозы и сорбита 1:3 и центрифугировали при 3600 g в течение 50 мин. Полученный осадок вакуолей промывали 1 М сорбитом, центрифугируя 30 мин при 3600 g.

Для экстракции полиР из клеток дрожжей использовали 3 способа: метод Лангена и Лисса в модификации Кулаева и др. (1960), этот же метод в модификации Чернышевой и др. (1971) и метод Кларк и др. (Clark et al., 1986). Для получения более концентрированных растворов полиР, облегчающих их осаждение солями Ba²⁺, количество экстрагента уменьшали от 2 до 20 раз в зависимости от содержания полиР во фракции. Экстракция полиР из клеток по методу Лангена и Лисса в модификации Кулаева и др. позволила разделить полимеры на пять фракций: кислоторастворимую (полиР1), солерастворимую (полиР2), две щелочерастворимые – при pH 9-10 (полиР3) и pH 12 (полиР4) и растворимую в горячей хлорной кислоте (полиР5).

Подготовка образца полиР и снятие ³¹P-ЯМР-спектров. Из полученных экстрактов полиР осаждали насыщенным раствором Ba(NO₃)₂ при pH 8,2. Из кислоторастворимой фракции выделяли два осадка полиР: сначала при pH 4,5, а затем при pH 8,2. Осадки полиР переводили в растворимую форму, обрабатывая их ионообменной смолой Dowex AG 50Wx8 в NH₄⁺-форме. Избыточное количество ионов Ba²⁺ и других металлов связывали добавлением к растворам полиР ЭДТА в концентрации 20 мМ. Значение pH образцов доводили до 7,2. Концентрация полиР в них варьировала от 150 до 1000 мкг Р/мл раствора. ³¹P-ЯМР-спектры снимали на приборе AM-400 фирмы «Bruker» (Германия) с преобразованием Фурье со сверхпроводящим магнитом и с рабочей частотой на ядрах ³¹P, равной 116,98 МГц. Число сканирований было более 1000. Длину цепи (n) полиР фракций рассчитывали по формуле, основанной на соотношении площадей пиков центральных (коровых, PP4) и терминальных (PP1) фосфатных групп в ³¹P-ЯМР-спектрах (Pilatus et al., 1989):

$$n = 2 (3 [PP1] + [PP4]) / [PP1]$$

Содержание полиР в полученных фракциях определяли после гидролиза аликвоты фракции в 1 М HCl на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Из кислоторастворимой фракции нуклеотиды удаляли сорбцией на активированный уголь Норит А. Количество полиР во фракциях рассчитывали

по образовавшемуся в результате гидролиза P_i , а в кислоторастворимой фракции – по разнице P_i до и после сорбции нуклеотидов на уголь.

Общий фосфор в каждой фракции определяли сжиганием на специальной плитке 0,2 мл фракции в концентрированной $HClO_4$ с постепенным повышением температуры до $150^\circ C$.

Ортофосфат, получившийся в результате гидролиза полиР, определяли после нейтрализации образцов по методу Беренблума и Чейна в модификации Вейль-Малербе и Грина (Weil-Malherbe and Green, 1951). Ортофосфат, образовавшийся в результате ферментативных реакций, определяли по методу Якке и др. (Yakka et al., 1981).

Ферментативные активности определяли как описано ранее: экзополифосфатазы цитозоля (Андреева и др., 1994); экзополифосфатазы и АТФазы вакуолей (Андреева и др. 1993); α -маннозидазы (Wilden et al., 1973) и α -глюкозидазы (Kratky et al., 1975).

За единицу количества фермента (Е) принимали такое его количество, которое катализировало образование 1 мкмоль P_i или *n*-нитрофенола за 1 мин.

Белок определяли по методу Лоури в модификации Петерсона (Peterson, 1977).

Очистка полиР от примесей низкомолекулярных компонентов. Неорганические полиР (Monsanto, США; Sigma, США), используемые при определении полифосфатазной активности, подвергали очистке от примесей орто-, пиро- и триполифосфатов на колонке (1,5 x 30 см) с Sephadex G-15 или G-25. 200-250 мг полиР в 20 мМ трис-HCl буфере, pH 7,2 наносили на колонку и элюировали тем же буфером, собирая фракции по 2 мл.

Сухую биомассу клеток дрожжей определяли нанесением аликвоты суспензии клеток на фильтры, доведенные до постоянной массы под вакуумом при температуре $85^\circ C$, и высушивали до постоянной массы в том же режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнительный анализ содержания фракций полифосфатов, выделенных различными методами из дрожжей *S. cerevisiae*.

Для количественного выделения из клеток дрожжей отдельных фракций полиР и определения длины их цепи методом ^{31}P -ЯМР, необходимо было подобрать наиболее оптимальный способ извлечения фракций из клеток. С этой целью было проанализировано несколько известных методов: экстракция полиР, разработанная Лангеном и Лиссом в модификации Кулаева и др.; метод, предложенный Чернышевой и др. и являющийся некоторой модификацией первого метода; и метод, успешно используемый для экстракции полиР из бактерий, сравнительно недавно предложенный Кларк и др. Из клеток дрожжей перечисленными методами были выделены фракции полиР и проведен их количественный и качественный анализ. Длину цепи полиР определяли

Таблица 1. Содержание (мкмоль Р/г сухой биомассы) и длина цепи (n) полиР фракций, выделенных из дрожжей *S.cerevisiae*.

Условия экстракции	Метод Лангена и Лисса в модификации Кулаева и др. (1960)				Метод Лангена и Лисса в модификации Чернышевой и др. (1971)				Метод Кларк и др. (Clark et al., 1986)			
	P _i	ПолиР	%	n	P _i	ПолиР	%	n	P _i	ПолиР	%	n
2% ТХУ-ацетон, 20°C, 3 мин									102	13	2	8-12
0,5 М НСlO ₄ , 0°C, 30 мин (полиР1)	93	209	32	8-26	93	209	32	8-26				
NaClO ₄ , 0°C, 60 мин (полиР2)		101	15	20-28		101	15	20-28				
2 мМ ЭДТА, pH 7-8, 20°C, 3 мин									3	256	39	29-35
NaOH, pH 9-10, 0°C, 30 мин (полиР3)		185	28	32-37								
2 мМ ЭДТА, pH 7-8, 20°C, фенол-хлороформ, 5 мин										170	25	37-46
NaOH, 0,05 М, 0°C, 30 мин (полиР4)		154	23	50-55								
1% SDS, pH 7.4, 0°C, 30 мин						228	35	50-62				
Сумма экстрагированных полиР		649	98			538	82			439	66	
0,5 М НСlO ₄ , 90°C, 40 мин (полиР5)		11	2			122	18			221	34	
Сумма полиР в биомассе		660	100			660	100			660	100	

с помощью ^{31}P -ЯМР. Результаты представлены в табл. 1. Из нее следует, что первый и второй методы позволяли экстрагировать полиР с большей длиной цепи, чем третий. Кроме того первый метод давал возможность наиболее полно извлечь полиР из клеток - 98% против 82% вторым и 66% третьим методами. И, наконец, он позволял разделить полиР дрожжевой клетки на 5 фракций, в то время как при помощи второго и третьего методов можно выделить только 4 фракции. Поэтому в дальнейших исследованиях был использован первый метод экстракции полиР.

2. Зависимость содержания и длины цепи фракций полиР в клетках от фазы роста дрожжей

Дальнейшие исследования были посвящены изучению количественных и качественных изменений полиР в клетках *S. cerevisiae* в процессе роста. Изучались дрожжи, находящиеся в разных фазах роста: посевной материал-инокулят (0 ч роста), начало (3 ч) и середина (6 ч) логарифмической фазы роста, фаза замедления роста (10,5 ч), начало стационарной фазы (15 ч) и стационарная фаза (24 ч) роста (рис.1).

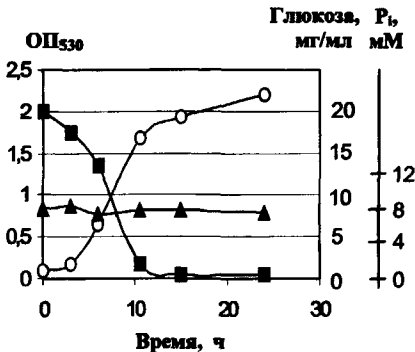


Рис. 1 Кривая роста (о) дрожжей *S. cerevisiae* на среде Ридер, содержание глюкозы (■) и фосфата (▲) в среде культивирования.

Как видно из рис.1, в течение 10 часов роста дрожжи полностью поглощали глюкозу из культуральной среды и переходили в стационарную фазу развития. При этом содержание ортофосфата (Р₁) в среде изменялось незначительно. В период активного роста дрожжей в них происходило увеличение содержания

Таблица 2. Содержание общей суммы полиР в клетках дрожжей *S. cerevisiae* на разных фазах роста.

	Время роста, ч					
	0	3	6	10,5	15	24
Сумма полиР, мкмоль Р/г сухой биомассы	376	440	544	240	216	345

суммарных полиР (табл.2, 3-6 часов). По мере исчезновения глюкозы из среды уровень их в клетках снижался и снова возрастал к 24 часам культивирования дрожжей (табл.2, 24 часа). Значительное снижение количества полиР в клетках на фоне истощения глюкозы и высокой концентрации P_i в среде свидетельствует о том, что в этот период полиР использовались как источник энергии.

Анализ содержания отдельных фракций полиР показал (рис.2), что они в процессе роста изменялись по-разному. Максимальных значений фракции достигали в логарифмической (рис.1 и 2, 6 ч) фазе роста, когда наиболее активно идут биосинтетические процессы и в среде достаточно глюкозы. После исчезновения глюкозы из среды дрожжи замедляли свой рост, и в этот период снижалось содержание полиР во всех фракциях (10,5-15 ч). Наибольшее количество полиР в логарифмической фазе роста накапливалось в кислоторастворимой (полиР1) и щелочерастворимой при pH 9-10 (полиР3) фракциях, их сумма составляла более 65% клеточного пула полиР (3 и 6 ч).

ПолиР, мкмоль Р/г
сухой биомассы

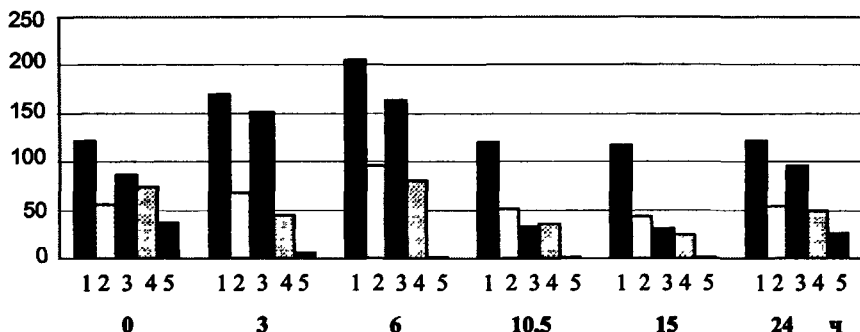


Рис.2. Изменение содержания отдельных фракций полиР в клетках в процессе роста дрожжей *S. cerevisiae*: 1 – полиР1; 2 – полиР2; 3 – полиР3; 4 – полиР4; 5 – полиР5. Фракции получали последовательной обработкой клеток при 0°C 0,5 М HClO_4 (полиР1), насыщенным раствором NaClO_4 (полиР2), раствором NaOH , pH 9-10 (полиР3), 0,05 М NaOH (полиР4) и 0,5 М HClO_4 при 90°C (полиР5).

Фракции полиР отличались не только уровнем накопления, но и степенью изменения содержания каждой из них в процессе роста культуры. Фракции полиР1 и полиР2 были подвержены наименьшим колебаниям. Содержание их в процессе роста дрожжей изменялось примерно в 1,5 раза. Наибольшими колебаниями характеризовались фракции полиР3 и полиР5. В зависимости от фазы роста культуры, уровень накопления фракции полиР3 изменялся в 5 раз, а фракции полиР5 - в 40 раз, причем максимального накопления последняя фракция достигала в стационарной фазе роста дрожжей (рис. 2).

Показано, что фракции полиР у дрожжей имеют различную длину цепи (Langen and Liss, 1960). Однако изменения степени полимерности отдельных фракций этих соединений в процессе роста *S. cerevisiae* не были изучены.

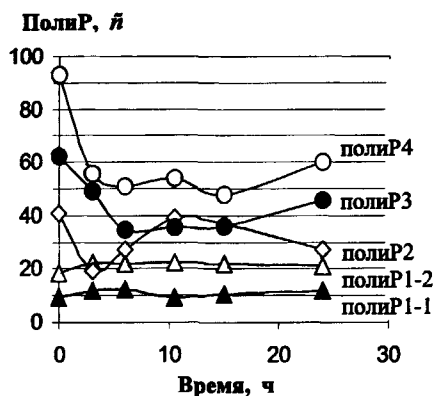


Рис. 3 Изменение длины цепи полиР отдельных фракций в процессе роста дрожжей *S. cerevisiae*. Условия эксперимента и опытные точки соответствуют условиям и точкам, указанным на рис.1 и 2.

Из рис.3 следует, что степень полимерности полиР двух подфракций кислоторастворимой фракции полиР1 в процессе роста оставалась постоянной. Субфракция полиР1-1 (осаждаемая ионами Ba^{2+} при pH 8,2) состояла из 8-12 фосфатных остатков. Вторая субфракция - полиР1-2 (осаждаемая ионами Ba^{2+} при pH 4,5), содержала более высокомолекулярные полиР, степень их полимерности равнялась 20-23 фосфатным остаткам. Длина цепи полиР трех других фракций: солерастворимой (полиР2) и двух щелочерастворимых (полиР3 и полиР4) была подвержена довольно значительным изменениям в процессе роста. Клетки, находящиеся в покое (0 ч и 24 ч роста) имели более высокую степень

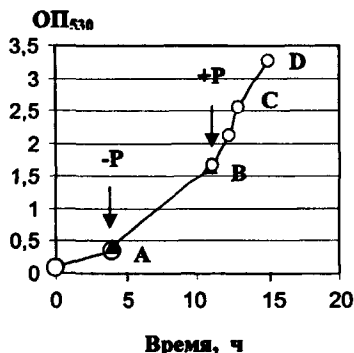
полимерности щелочерастворимых фракций полиР3 и полиР4 по сравнению с активно растущими клетками. Степень полимерности фракции полиР2 вначале падала, в период активного роста культуры она увеличивалась, а в стационарной фазе снова снижалась. Причем длина цепи этой фракции могла иметь значения, равные значениям фракций полиР1 или полиР3. Таким образом, в процессе роста дрожжей длина цепи полиР разных фракций может существенно изменяться в зависимости от фазы роста культуры.

Полученные данные свидетельствуют о том, что полиР в процессе роста культуры дрожжей находятся в состоянии активного обмена, причем каждая отдельная фракция полиР характеризуется своей динамикой накопления и потребления, что, видимо, является отражением разной локализации и, возможно, функциональной специфичности этих фракций в клетке. Длина цепи, выделяемых из клеток фракций полиР, зависит не только от природы экстрагента (Langen and Liss, 1960), но и от фазы роста дрожжей.

3. Влияние концентрации P_i в среде на накопление и степень полимерности фракций полифосфатов у дрожжей *S. cerevisiae*.

В дальнейшем было важно выяснить, в какой степени экстремальные условия, вызванные резкими колебаниями концентрации P_i в среде, влияют на

уровень и структуру отдельных фракций полиР. Подобные данные могли бы иметь существенное значение для более глубокого понимания роли полиР в жизнедеятельности микробной клетки и ее выживании в изменяющихся условиях внешней среды. Вначале были подобраны условия, позволявшие получить эффект гиперкомпенсации полиР, когда после длительного фосфорного голодания клеток и последующего переноса их на среду с фосфатом, последние накапливают в несколько раз больше полиР, чем в обычных условиях. Окончательная схема эксперимента представлена на рис.4.



эффект гиперкомпенсации полиР (табл.3 точка С). Их количество достигало 2/3 суммарного фосфора клеток дрожжей против 1/2 в обычных условиях роста. За счет прироста этого полимера содержание общего фосфора увеличивалось более, чем в 1,5 раза.

Особый интерес представляет динамика накопления в клетке отдельных фракций полиР.

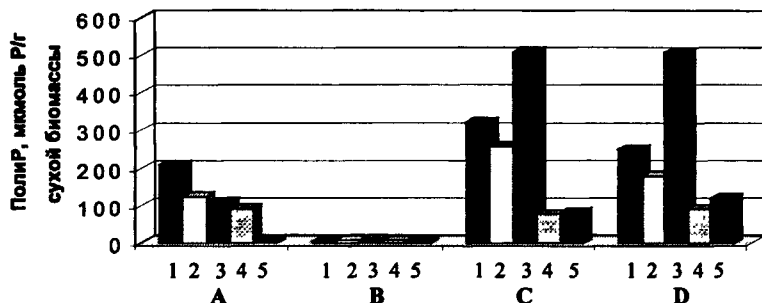


Рис.5. Содержание отдельных фракций полиР в клетках дрожжей при культивировании на полной среде (А), в условиях фосфорного голодания (В) и гиперкомпенсации полиР (С и D). Обозначения: 1 - полиР1, 2 - полиР2, 3 - полиР3, 4 - полиР4, 5 - полиР5.

Как видно из рис.5, основную часть синтезированных в процессе гиперкомпенсации полиР составляли кислоторастворимая (полиР1), солерастворимая (полиР2) и щелочерастворимая при pH 9-10 (полиР3) фракции, на долю которых приходилось около 80% всех полиР клетки (точка С). Необходимо отметить и различие в степени накопления отдельных фракций. Так, уровень накопления фракций полиР3 и полиР5 увеличивался примерно в 5 и 8 раз, соответственно, а полиР1 и полиР2 – в 1,5 и 2 раза по сравнению с исходными клетками (точки С и А). В течение последующих 2 ч роста дрожжей происходило незначительное изменение содержания отдельных фракций (точка D). Необходимо отметить особое поведение полиР щелочерастворимой при pH 12 фракции (полиР4), уровень которой в условиях гиперкомпенсации лишь к 4 ч роста на среде с фосфатом достигал уровня в исходных клетках (точки А, С и D), из чего следовало, что фракция полиР4 не подчинялась эффекту гиперкомпенсации. Полученные результаты свидетельствуют о том, что пути синтеза отдельных фракций полиР различны или, по крайней мере, они по-разному регулируются в условиях гиперкомпенсации.

На рис. 6 представлено изменение длины цепи каждой фракции в процессе фосфорного голодания клеток и в условиях гиперкомпенсации полиР. Рост дрожжей на среде без фосфата сопровождался не только падением содержания полиР, но и значительным уменьшением длины цепи фракций

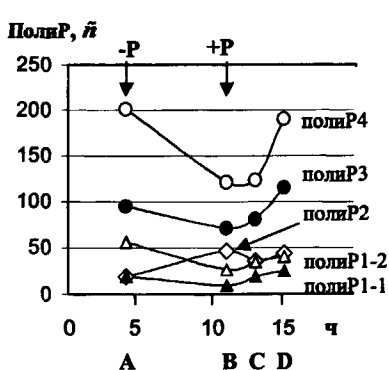


Рис. 6. Зависимость длины цепи (n) полиР различных фракций в клетках дрожжей от содержания P_i в среде культивирования. Экспериментальные точки А, В, С и D соответствуют точкам на рис. 4 и 5.

фракция полиР3, или незначительного – фракция полиР4, отмечался резкий рост длины цепи этих соединений (точки С и D). Т.е. наблюдался ступенчатый характер синтеза отдельных фракций полиР, когда в условиях гиперкомпенсации вначале образовалось сверхвысокое количество этих соединений, и только в процессе дальнейшего роста дрожжей происходило увеличение длины цепи этих соединений.

4. Накопление полифосфатов в вакуолях дрожжей *S. cerevisiae*.

Из полученных данных следовало, что каждая фракция полиР в процессе развития культуры дрожжей характеризуется своей динамикой накопления и потребления. Не исключено, что такое поведение фракций отражает не только разную их клеточную локализацию, но и, что очень важно, выполнение ими различных функций в жизнедеятельности этого микроорганизма, возможно, связанных с особенностями метаболизма клеточного компартмента. К настоящему времени полиР обнаружены во многих клеточных структурах: цитоплазме, клеточной оболочке, ядрах, митохондриях и вакуолях (Кулаев et al., 2004). По данным литературных источников в вакуолях в определенных условиях может находиться основной пул клеточных полиР. В связи с этим, интересно было изучить накопление полиР в этом компартменте клетки в используемых нами условиях. Для этого из клеток дрожжей вначале были получены сферопласты, а затем наиболее щадящим для полиР способом (Wiemken, A., and M. Dürr, 1974) в изотонических условиях, была выделена

полиР1, полиР3 и полиР4. ПолиР солеарастворимой фракции (полиР2) во время фосфорного голодания, напротив, наращивали длину цепи (точка В).

После переноса клеток на фосфат содержащую среду, в первые 2 ч интенсивного синтеза полиР длина цепи фракций полиР3 и полиР4 почти не изменялась (точки В и С). Возможно, что в этот период активный синтез полиР протекал либо на уровне сравнительно низкомолекулярных (причем для каждой фракции своей степени полимерности) соединений, либо, одновременно с синтезом, происходило интенсивное их потребление. При дальнейшем росте дрожжей на среде с фосфатом на фоне полного отсутствия накопления –

фракция вакуолей. В табл.4 представлены данные содержания полиР в целых клетках и вакуолях.

Таблица 4. Содержание P_i и полиР (мкмоль Р/г сухой массы клеток) в целых клетках и вакуолях в условиях стандартного уровня P_i (9 мМ) в среде культивирования.

Объект исследования	P_i	ПолиР	ПолиР, %
Клетки	111	543	100
Вакуоли	3,3	74	14

В логарифмической фазе роста дрожжей в вакуолях содержалось около 15 % клеточного пула полиР (табл.4). Остальные полиР, очевидно, были расположены в других клеточных органеллах: цитоплазме, ядре, митохондриях. Экстракцией из вакуолей были выделены две фракции полиР: кислото- и щелочерастворимая. Из табл. 5 видно, что кислоторастворимая фракция

Таблица 5. Распределение полиР вакуолей по фракциям и степень их полимерности.

Фракция	Содержание полиР, (%)	Степень полимерности, $\bar{n}$
Кислоторастворимая фракция: pH 4,5 pH 8,2	44,2	20±5
	39,4	5±2
Щелочерастворимая фракция	12	-
Остаток	4,4	-
Сумма полиР вакуолей	100	

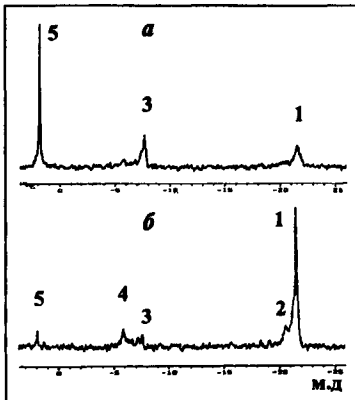


Рис. 7. ^{31}P -ЯМР-спектры (+5 - -30 м.д.) фракции кислоторастворимых полиР, экстрагированных из вакуолей дрожжей *S. cerevisiae*: а - спектр субфракции полиР1-1; б - спектр субфракции полиР1-2. 1 - Коровые (внутренние) фосфатные группы полиР; 2 - предтерминальные фосфатные группы полиР; 3 - терминальные фосфатные группы полиР; 4 - γ -фосфатные группы нуклеозидтрифосфатов; 5 - P_i .

составляла более 80% полиР вакуолей. Осаждением ионами Ba^{2+} при разных значениях pH она была разделена на две субфракции, различавшиеся степенью полимерности: 5 ± 2 (при pH 8,2) и 20 ± 5 , (при pH 4,5) (рис.7). В щелочерастворимой фракции находилась незначительная часть полифосфатного пула вакуолей (12%).

Таким образом, полученные данные убедительно доказывают, что в вакуолях изучаемой культуры расположена лишь часть клеточных полиР, основная масса которых представляет собой низкомолекулярную кислоторастворимую фракцию этих соединений. Имеющиеся в литературе данные о локализации основного пула этих соединений в вакуолях объясняются, видимо, изменениями содержания полиР в разных компартментах клетки, зависящими от особенностей изучаемого биологического объекта, состава среды выращивания и фазы развития организма.

Таблица 6. Содержание полиР в клетках и вакуолях дрожжей *S. cerevisiae*. Дрожжи растили в течение 4 ч на среде, содержащей 9 мМ Р, («+Р»), затем в течение 7 ч на бесфосфатной среде («-Р»), и еще в течение 2 ч на среде со стандартным (9 мМ) уровнем Р, («+Р», гиперкомпенсация).

Условия культивирования	Клетки		Вакуоли	
	мкмоль Р/г сух. биомассы	%	мкмоль Р/г сух. биомассы	%
«+Р»	544	100	74	100
«-Р»	65	12	9	12
«+Р», гиперкомпенсация	1236	230	21	28

В вакуолях в условиях голодания, полиР используются в той же степени, что и в клетках в целом (табл.6). Но при гиперкомпенсации, в отличие от целых клеток, количество полиР в вакуолях увеличивалось незначительно и достигало примерно 30% содержания полимера в этом же компартменте дрожжей в обычных условиях роста (табл. 6).

Таким образом, при росте дрожжей в условиях гиперкомпенсации в вакуолях не удалось обнаружить сверхсинтез полимера. Полученные результаты свидетельствуют о возможности существования в разных компартментах клетки различных механизмов регуляции биосинтеза полиР.

4. Влияние ингибиторов на накопление полифосфатов у дрожжей *S. cerevisiae*.

Пути, обеспечивающие накопление полиР в клетках дрожжей, и, в частности, роль в этом экзополифосфатаз, деградирующих эти полимеры, остаются малоизученными. Одним из подходов к изучению механизма синтеза этих соединений является использование биохимических ингибиторов. В связи с этим было исследовано влияние на накопление полиР в условиях активного

их синтеза следующих ингибиторов: циклогексимида (ЦГИ) протонофора карбонилцианид-4-(трифторметокси) фенилгидразона (FCCP), бафиломицина А1 и 2-дезоксид-глюкозы (2ДГ).

Таблица 7. Влияние ингибиторов на накопление полиР, содержание Р_i в целых клетках и общую активность экзополифосфатаз I и II в цитозоле дрожжей *S. cerevisiae* после переноса клеток из среды без фосфата в полную среду и культивирования в течение 2 часов.

Вариант опыта	Сухая биомасса, г / л	Р _i , мкмоль Р/г сухой биомассы	ПолиР, мкмоль Р/г сухой биомассы	Общая активность, Е/г сухой биомассы	
				экзополи-фосфатаза I	экзополи-фосфатаза II
исходная культура	1,56	100	75	18,5	1,1
контрольная культура (без ингибитора)	2,9	170	730	10,3	10,2
циклогексимид (10 мкг/мл)	1,6	180	660	14,5	3,4
FCCP (10 мкМ)	2,3	120	540	13,0	14,0
2-дезоксид-глюкоза (12 мМ)	2,09	246	422	14,5	8,2
бафиломицин А1, (0,05 мкМ)	2,9	180	660	11,2	12,8

Дрожжи после голодания по фосфату (исходная культура) переносили на свежую, полноценную среду и культивировали в присутствии соответствующего ингибитора в течение 2-х часов. За этот период в клетках возрастал уровень Р_i и почти на порядок увеличивалось суммарное содержание полиР (табл.7).

Из данных табл. 7 видно, что исследуемые ингибиторы в различной степени влияли на рост дрожжей. Различное влияние они оказывали и на накопление полиР.

Ингибитор белкового синтеза ЦГИ, подавляя полностью рост дрожжей, тем не менее, практически не влиял на общее накопление полиР и уровень Р_i в клетках. В то же время он оказывал различное воздействие на синтез отдельных фракций. Несколько снижая уровни фракций полиР1 и полиР3, ЦГИ полностью ингибировал синтез фракции полиР4 (табл.8). Это, видимо, являлось следствием подавления ЦГИ образования компонента клеточной стенки маннопротеина, биосинтез маннановой части которого, как показано, сопряжен с биосинтезом полиР4 (Вагабов, 1988).

Протонофор FCCP, разрушающий градиент электрохимического потенциала на мембранах дрожжевой клетки, примерно в 2 раза тормозил рост дрожжей (табл.7). В клетках, по сравнению с контрольным вариантом, был значительно ниже уровень Р_i и наблюдалось уменьшение на 25% суммарного

накопления полиР. При этом ингибитор полностью подавлял накопление фракции полиР4 и, за исключением полиР2, только снижал прирост остальных фракций (табл.8). Следовательно, можно считать, что накопление, по крайней мере, части полиР в условиях активного их синтеза зависит от $\Delta\mu\text{H}^+$ на мембранах, особенно это относится к фракции полиР4.

Таблица 8. Влияние ингибиторов на накопление отдельных фракций полиР у дрожжей *S. cerevisiae* после переноса клеток из среды без фосфата в полную среду и культивирования в течение 2 часов. Прирост полиР каждой фракции в варианте без ингибитора по сравнению с исходными клетками принят за 100% (контроль).

Фракции полиР	В а р и а н т ы				
	Контроль, 2 ч., «+Р»	ЦГИ, 2 ч., «+Р»	ФССР, 2 ч., «+Р»	Бафиломицин А1, 2 ч., «+Р»	2ДГ, 2 ч., «+Р»
ПолиР1	100	80	64	103	63
ПолиР2	100	178	148	74	61
ПолиР3	100	72	60	66	3
ПолиР4	100	0	0	76	68
ПолиР5	100	105	20	80	110

Бафиломицин А1, ингибитор H^+ -АТФазы вакуолярной мембраны, в отличие от других ингибиторов, не влиял на рост дрожжей, а суммарное накопление полиР подавлял в такой же степени как и ЦГИ. Не затрагивая содержание фракции полиР1, он уменьшал прирост накопления остальных фракций по сравнению с контролем в пределах 15-30%. (табл.8).

2-Дезоксиглюкоза, ингибитор углеводного обмена, значительно снижал рост дрожжей (на 60%) и суммарное содержание полиР (на 47%). Подавляя на 35-40% прирост фракций полиР1 и полиР2, он полностью ингибировал накопление фракции полиР3, что свидетельствует о тесной связи ее синтеза с углеводным обменом (Кулаев, 1975).

Кроме полиР в цитозоле клеток определяли экзополифосфатазную активность. В данном компартменте дрожжей, наряду с низкомолекулярной, основной экзополифосфатазой I, обнаружена экзополифосфатаза II, отличающаяся от первой рядом свойств и более высокой молекулярной массой (Андреева и др., 2001). В контрольном варианте общая активность экзополифосфатаз фактически оставалась на уровне исходной культуры, но при этом изменялось их соотношение: в 2 раза снижалась активность экзополифосфатазы I, и примерно в 10 раз увеличивалась активность экзополифосфатазы II (табл.7). Это давало возможность предполагать, что экзополифосфатаза II может участвовать в биосинтезе полиР в этих условиях. Однако сравнительный анализ результатов по влиянию ингибиторов на накопление полиР и активность этого фермента не позволял судить о его участии в синтезе или деградации общего пула полиР (табл.7).

Таким образом, проведенный анализ показал различную степень влияния ингибиторов на накопление отдельных фракций полиР, что указывает на существование у дрожжей множественности путей биосинтеза этих соединений. Отсутствие корреляции между накоплением полиР и экзополифосфатазами цитозоля в присутствии ингибиторов свидетельствует скорее в пользу того, что эти ферменты не оказывают существенного влияния на накопление полиР.

Влияние инактивации генов *PPX1* и *PPN1* на уровень полифосфатов у дрожжей *S. cerevisiae*.

К основным ферментам деградации полиР в клетках дрожжей кроме экзополифосфатаз, относятся и эндополифосфатазы, расщепляющие молекулы полиР на более низкомолекулярные фрагменты. Важным остается вопрос участия этих полифосфатаз в метаболизме отдельных фракций полиР. С этой целью были исследованы следующие мутанты по этим ферментам: родительский штамм CRY, мутант CRX с инактивированным геном *PPX1*, кодирующим экзополифосфатазу цитозоля, мутант CRN с инактивированным геном *PPN1*, кодирующим эндополифосфатазу вакуолей и мутант CNX с инактивированными обоими генами *PPX1* и *PPN1* (Wurst et al., 1995; Kumble and Kornberg, 1996; Sethuraman et al., 2001).

Таблица 9. Содержание полиР в клетках 4-х штаммов дрожжей в стационарной стадии роста. (1 - мкмоль Р/г сухой биомассы). Все штаммы выращивали на среде YPD в течение 24 часов.

Соединение	Штамм			
	CRY	CRX	CRN	CNX
Сумма полиР	283	359	407	507

Из представленных в табл.9 данных видно, что мутации в генах *PPX1* и *PPN1* повлияли на накопление полиР у мутантов. Общая сумма полиР увеличивалась в ряду культур CRY, CRX, CRN, и CNX. Большая часть клеточных полиР, от 46% до 67% общей их суммы, у всех 4-х штаммов была представлена кислоторастворимой фракцией, которая в точности повторяла у них тенденцию поведения суммарных полиР (рис.8). Из остальных фракций только у двойного мутанта CNX, не содержащем ни цитозольных экзополифосфатаз, ни вакуолярной эндополифосфатазы, был выше уровень целочерастворимой фракции полиР3. Содержание солерастворимой фракции полиР2 мало отличалось у всех 4-х штаммов. У всех штаммов наблюдался невысокий уровень фракций полиР4 и полиР5 (рис.8).

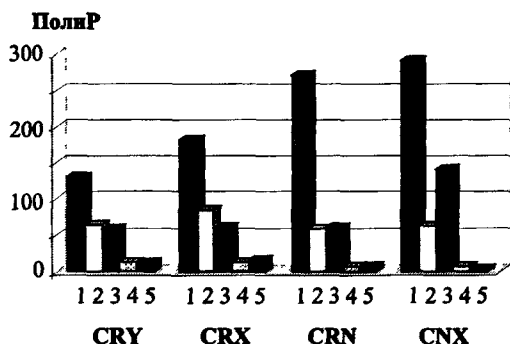


Рис. 8. Содержание фракций полиР (мкмоль Р/г сухой биомассы) штаммов CRY, CRX, CRN и CNX. Обозначения: 1 – полиР1; 2 – полиР2; 3 – полиР3; 4 – полиР4; 5 – полиР5.

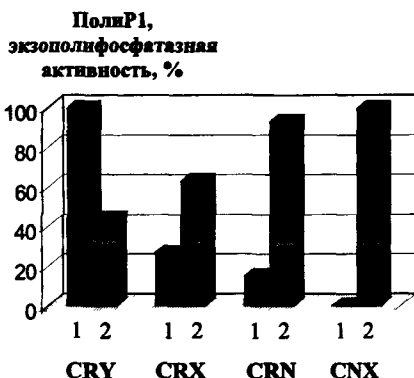


Рис. 9. Содержание полиР1 и экзополифосфатазной активности в цитозоле в родительском и мутантных штаммах *S. cerevisiae* в стационарной стадии роста. Обозначения: 1 – экзополифосфатазная активность, 2 – фракция полиР1. 100% для экзополифосфатазной активности соответствуют 39 Е/г, а для фракции полиР1 – 292 мкмоль Р/г сухой биомассы клеток.

У рассматриваемых штаммов общее количество полиР находилось в обратной зависимости от уровня экзополифосфатазной активности цитозоля. Т.к. общий пул полиР у штаммов определялся в значительной степени уровнем кислоторастворимой фракции полиР1 (табл. 9, рис.8), можно считать, что на самом деле от уровня экзополифосфатазной активности, в первую очередь, зависит уровень фракции полиР1 (рис. 9). Следовательно, полученные данные впервые указывают на взаимосвязь между метаболизмом отдельной кислоторастворимой фракции полиР1 и экзополифосфатазой цитозоля.

Таким образом, данные о содержании полиР у мутантных штаммов дрожжей с поврежденными структурными генами полифосфатаз впервые продемонстрировали возможную функциональную связь низкополимерной фракции полиР1 и, частично, высокополимерной полиР3 с экзополифосфатазами и эндополифосфатазой.

ВЫВОДЫ

1. Впервые сочетанием методов химической экстракции и ^{31}P -ЯМР-спектроскопии выделены и охарактеризованы отдельные фракции полиР, различающиеся изменением степени полимерности и динамикой накопления и потребления в процессе роста *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Выявлен ступенчатый характер синтеза щелочерастворимых полифосфатов, характеризующийся тем, что на первом этапе после фосфатного голодания происходит накопление этих соединений, а на следующем – только увеличение длины их цепи.
3. Обнаружено, что полифосфаты вакуолей и щелочерастворимой фракции полиР₄, в отличие от основной массы этих соединений клетки, не подвержены гиперкомпенсации, что указывает на существование различных механизмов регуляции синтеза полиР у дрожжей.
4. Установлено, что ингибиторы биохимических процессов по-разному влияют на накопление отдельных фракций полифосфатов, в частности, процесс синтеза фракции полиР₄ является более чувствительным к действию протонификатора FCCP и циклогексимида, а фракции полиР₃ – к действию 2-дезоксиглюкозы.
5. С помощью мутантов с инактивированными генами экзополифосфатазы цитозоля PRX1 и эндополифосфатазы PPN1, впервые выявлена метаболическая связь между содержанием кислоторастворимой фракции полиР₁ и уровнем экзополифосфатазной активности цитозоля у дрожжей.
6. Совокупность полученных данных дает основания выдвинуть гипотезу о множественности путей биосинтеза отдельных фракций полифосфатов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

БЛАГОДАРНОСТИ

В заключении автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям: член-корреспонденту РАН, профессору Игорю Степановичу Кулаеву и д.б.н. Владимиру Мамедовичу Вагабову за постоянное внимание к работе и обсуждение полученных результатов, а также к.б.н. Н.А. Андреевой и к.б.н. Л.П. Личко, совместно с которыми проведена часть экспериментальной работы и А.В. Мудрик за оказанную помощь при проведении экспериментов.

Список работ опубликованных по теме диссертации:

1. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Щипанова И.Н., Сибельдина Л.А., Кулаев И.С. (1998). Изменение длины цепи неорганических полифосфатов в зависимости от стадии роста *Saccharomyces cerevisiae*. Микробиология. Т. 67. № 3. С. 193-198.
2. Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В., Личко Л.П., Андреева Н.А., Трилисенко Л.В. (2000). Развитие идей А.Н. Белозерского по биохимии полифосфатов. Биохимия. Т. 65. №3. С. 325-333.
3. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кулаев И.С. (2000). Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Биохимия. Т. 65. № 3. С. 414-420.
4. Трилисенко Л.В., Вагабов В.М., Кулаев И.С. (2002). Содержание и длина цепи полифосфатов вакуолей дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ У-1173. Биохимия. Т.67. № 5. С. 711-716.
5. Трилисенко Л.В., Андреева Н.А., Кулаковская Т.К., Вагабов В.М., Кулаев И.С. (2003). Ингибиторный анализ обмена полифосфатов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в условиях гиперкомпенсации. Биохимия. Т. 68. № 5. С. 706-711.
6. Kulakovskaya T.V., Andreeva N.A., Trilisenko L.V., Vagabov V.M., Kulaev I.S. (2004). Two exopolyphosphatases in *Saccharomyces cerevisiae* cytosol at different culture conditions. Proc. Biochem. V. 39. P. 1625-1630.
7. Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В., Андреева Н.А., Личко Л.П., Трилисено Л.В. (2005). Особенности метаболизма и функций высокомолекулярных неорганических полифосфатов у низших эукариот на примере дрожжей. Молекулярная биология. Т.39, № 4. С. 415 ~~561-580~~
8. Vagabov V.M., I.N. Shipanova, L.V.Trilisenko, L.A. Sibel'dina. I.S. Kulaev, (1996). "³¹P-NMR study of polyphosphate in yeast cells" in "Phosphorus, Sulfur, Silicon", Ed. I. Heby, Gordon and Breach publishers inc., London. P. 17-27.
9. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В. (1997.) Изменение содержания и длины цепи неорганических полифосфатов в зависимости от условий роста дрожжей. 2-й съезд биохимического общества РАН, Пущино, ПНЦ. С. 175.
10. Kulaev I.S, Vagabov V.M., Kulakovskaya T.V., Lichko L.P., Andreeva N.A., Trilisenko L.V. (2000). New aspects of polyphosphate biochemistry. Intern. Symp. "Modern problem of microbiol biochemistry and biotechnology". Pushchino. P. 12.
11. Trilisenko L.V., Shchipanova I.N., Sibeldina L.A., Vagabov V.M. (2000). ³¹P-NMR spectroscopic study of polyphosphates in the yeast. In "Modern problems of microbial biochemistry and biotechnology". Pushchino. P. 60.

•

•

•

•

№ 21268

РНБ Русский фонд

2006-4

22895

Подписано в печать 20 октября 2005 г.
Заказ 490. Формат 60 х 90/16.
Тираж 100 экз.
Отпечатано в салоне оперативной печати ПКФ.
Москва, Садовая-Черногрозская, 3Б.