

на правах рукописи

**Томашевский Александр Андреевич**

**НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ПОЛИФОСФАТЫ ПРИ НАРУШЕНИЯХ  
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРОТОННЫХ АТФаз У  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

03.01.04 – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Пушино – 2011

Работа выполнена в лаборатории регуляции биохимических процессов Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

**Научные руководители:** член-корреспондент РАН, профессор  
Кулаев Игорь Степанович  
доктор биологических наук  
Кулаковская Татьяна Валентиновна

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
Калебина Татьяна Сергеевна  
доктор биологических наук  
Меденцев Александр Григорьевич

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук  
Институт биохимии им. А.Н. Баха

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011г. В \_\_\_\_ час. На заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при Учреждении Российской академии наук 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 Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН.

Автореферат размещен на сайте: <http://www.ibpm.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011г.

Учёный секретарь Диссертационного совета,

Доктор биологических наук



Вагабов В.М.

**Актуальность проблемы.** Неорганические полифосфаты (полиР), представляющие собой линейные полимеры ортофосфата ( $P_i$ ), выполняют в клетке многочисленные функции. Они участвуют в резервировании фосфата, связывании катионов, образовании мембранных каналов, в регуляции активности ферментов и экспрессии генов. У высших эукариот полиР участвуют в процессах свёртывания крови, пролиферации клеток, регуляции кальцификации и декальцификации в костной ткани [Кулаев и др., 2005; Rao et al., 2009; Caen and Wu, 2010].

Представление о том, что метаболизм полиР тесно связан с энергетическим обменом, является общепризнанным, поскольку энергия фосфоангидридных связей этих полимеров близка к таковой АТФ, основного переносчика энергии в клетке [Kornberg et al., 1999; Кулаев и др., 2005]. У бактерий вовлечение их в энергетический обмен обеспечивается полифосфаткиназой и полифосфат:АМР фосфотрансферазой, непосредственно связывающими полиР и АТФ в единых путях метаболизма. В эукариотических клетках участие полиР в энергетическом метаболизме исследовано в значительно меньшей степени. У *Neurospora crassa* обнаружена 1,3-дифосфоглицерат:полифосфат фосфотрансфераза [Бобык и Кулаев, 1971]; у дрожжей этот фермент не найден. Однако известно, что у дрожжей биосинтез этих полимеров зависит от источника углерода и тесно связан с основными путями обеспечения клеток энергией [Вагабов и др., 2008]. Вопрос о том, каким образом различные энергетические состояния клетки сказываются на обмене полиР, является актуальным, в особенности в связи с проблемой их участия в регуляции различных процессов в клетках эукариот.

Актуальность изучения обмена полиР у дрожжей определяется важностью понимания функций этих биополимеров в эукариотической клетке. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* благодаря доступности мутантов по генам, кодирующим большинство их ферментов, являются удобной моделью для исследования проблемы взаимосвязи энергетического обмена и обмена полиР у эукариот.

Одним из подходов к решению этой проблемы является изучение влияния мутаций, вызывающих нарушение функционирования основных  $H^+$ -АТФаз дрожжевой клетки (митохондриальной АТФазы,  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны,  $H^+$ -АТФазы вакуолей) на накопление и расходование неорганических полифосфатов. Такие мутанты в настоящее время получены в различных лабораториях и доступны для использования, однако метаболизм полиР у них не изучался.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлось изучение влияния мутаций, нарушающих функционирование митохондриальной, вакуолярной и плазматической  $H^+$ -АТФаз дрожжей на обмен полиР у *S. cerevisiae*.

**Были поставлены следующие задачи:**

- 1) Изучить влияние мутаций в гене *ATP22* (кодирующем белок, участвующий в посттрансляционной сборке гидрофобной части  $F_0$  митохондриальной АТФ-синтетазы [Helfenbein et al., 2003]), нарушающих синтетическую функцию АТФазы митохондрий, на особенности метаболизма полифосфатов на разных стадиях роста в целых клетках дрожжей, а также во фракции митохондрий.
- 2) Изучить влияние мутации в гене *PMA1* (кодирующем  $H^+$ -АТФазу плазматической мембраны [Petrov et al., 2000]), снижающей активность этой АТФазы, на особенности метаболизма полифосфатов на разных стадиях роста.
- 3) Изучить влияние мутации в гене *VMA2* (кодирующем белок  $b$  субъединицы  $v1$  домена вакуолярной АТФазы [Milgrom et al., 2007]), нарушающей функционирование  $H^+$ -АТФазы вакуолярной мембраны, на особенности метаболизма полифосфатов в условиях избытка и недостатка  $P_i$ .

**Научная новизна работы.** Впервые проведено систематическое сравнение влияния мутаций, нарушающих функционирование основных  $H^+$ -АТФаз дрожжей *S. cerevisiae* на содержание и длину цепи неорганических полифосфатов различных фракций, характеризующихся неодинаковой степенью полимерности и зависимости от стадии роста и содержания фосфата в среде.

Установлено, что нарушение синтетазной функции митохондриальной АТФазы вызывает снижение накопления полифосфатов и их длины цепи на стационарной стадии роста в целых клетках, где основным источником энергии для дрожжевой клетки является окислительное фосфорилирование на уровне дыхательной цепи. В наибольшей степени у мутанта подавляется накопление кислоторастворимой фракции полиР1 и щелочерастворимой фракции полиР3, что свидетельствует о значимости окислительного фосфорилирования для синтеза этих фракций. Обнаружено, что в отличие от общего содержания полиР в клетке, содержание полиР в митохондриях практически не изменяется при нарушении синтеза АТФ в этих органеллах.

Показано, что мутация, уменьшающая активность  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны вдвое, не оказывает существенного влияния на содержание и длину цепи полифосфатов в клетках.

Установлено, что нарушение функционирования вакуолярной  $H^+$ -АТФазы за счет мутации в гене *IMA2* приводит к тому, на мембране этих органелл не образуется электрохимический градиент ионов  $H^+$ . При этом наблюдается резкое уменьшение содержания полиР в клетках. Единственной фракцией полиР, способной к динамичному изменению в зависимости от стадии роста и содержания фосфата в среде, остается низкополимерная фракция полиР1. По-видимому, часть этих полиР синтезируется независимо от электрохимического потенциала на вакуолярной мембране, и кроме известной вакуолярной полиР-синтетазы, в их накоплении принимают участие другие ферментные системы. Остальные, более высокополимерные фракции полиР при этой мутации остаются на очень низком уровне независимо от изменения условий среды.

**Научно-практическое значение.** Настоящая работа относится к разряду фундаментальных исследований, однако полученные данные позволяют расширить представление о фосфорном метаболизме и значении неорганических полифосфатов в клетках дрожжей, имеющих большое практическое значение и широко используемых

в различных отраслях народного хозяйства. Полученные данные необходимо учитывать при исследованиях метаболизма полиР у других представителей эукариот.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, экспериментальной части и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на страницах, содержит 14 таблиц и 11 рисунков. Библиографический указатель содержит 237 источников литературы.

**Апробация работы и публикации.** Результаты работы были доложены на ряде конференций: на 13<sup>ой</sup> и 14<sup>ой</sup> конференции молодых ученых «Биология – наука 21<sup>го</sup> века» (Пушино, 2009; 2010) и 2<sup>ом</sup> Междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2010). По материалам диссертации опубликованы 3 статьи в журналах, входящих в список, рекомендованный ВАК.

**Благодарности.** Автор приносит благодарность своим научным руководителям чл.-корреспонденту РАН Игорю Степановичу Кулаеву, д.б.н. Татьяне Валентиновне Кулаковской за постоянное внимание к работе и обсуждение её результатов. Автор благодарит А. Цаголова (Columbia University, США), П. Кейн (SUNY Upstate Medical University, США) и В.В. Петрова (ИБФМ РАН) за предоставление мутантных штаммов *S. cerevisiae*, М.С. Христина (ИФПБ РАН) за помощь при флуориметрических измерениях, а также всех сотрудников лаборатории регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН за содействие при выполнении работы.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами работы были следующие штаммы дрожжей *S. cerevisiae*: D273 (родительский штамм), N417 и E232 (различные делеции в гене *ATP22*), предоставленные А. Tzagoloff (Columbia University, США), ВУ 4741 (родительский штамм) и ВУ 4741 *Vma2Δ* (делеция в гене *VMA2*), предоставленные Patricia Kane (SUNY Upstate Medical University, США), NY13 (родительский штамм) и T850A

(замена в гене *PMA1*), предоставленные к.б.н. В.В.Петровым (ИБФМ РАН). Для культивирования использовали среды YPD (2% пептон, 1% дрожжевой экстракт, 2% глюкоза). В среду добавляли  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  до концентрации 10 мМ. Для выращивания в условиях фосфорного голодания использовали  $\text{P}_i$ -дефицитную среду согласно [Rubin, 1973]. Для опытов по гиперкомпенсации полиР в среду добавляли  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  до концентрации 20 мМ. Культивирование дрожжей вели в колбах при 29°C на качалке (~120 об/мин) с объемом среды 200 мл в 750 мл колбе. Для изучения содержания полиР в условиях гиперкомпенсации использовали краткосрочное культивирование при высокой плотности дрожжевой культуры [Кулаковская и др., 2005]. Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования [Zinzer and Daum, 1995].

Ферментативные активности изолированных митохондрий определяли следующим образом: экзополифосфатазную активность определяли по скорости образования  $\text{P}_i$  при 30°C в течение 30 мин в 1 мл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 7,2, 2,5 мМ  $\text{MgSO}_4$  и 1 мМ полиР<sub>188</sub> (по лабильному фосфору). За единицу активности (Е) принимали количество фермента, образующего 1 мкмоль  $\text{P}_i$  за 1 мин. АТФазную активность определяли по скорости образования  $\text{P}_i$  при 30°C в течение 30 мин в 1 мл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 8,5, 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 0,1% Тритон Х-100 и 1 мМ АТФ.

Для определения активности плазматической АТФазы *in situ* клетки осаждали, два раза промывали деионизованной водой. 1 г клеток ресуспендировали в 10 мл буфера (0,01 М MES-NaOH рН 6,5, 0,1 М КСl, 0,004 М  $\text{MgSO}_4$  и 2% глюкозы в качестве осмотического стабилизатора), после чего добавляли 0,5 мл 1%-ного раствора Тритона Х-100, разливали по 1 мл в пробирки и замораживали при -70 градусах Цельсия. Пробы клеток оттаивали во льду, осаждали и ресуспендировали в 200 мкл того же буфера без добавления Тритона Х-100. Аликвоты (0,05 мл) суспензии клеток добавляли к 0,95 мл того же буфера, содержащего 5 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 5 мМ АТФ, 20 мМ  $\text{KNO}_3$ , 5 мМ  $\text{NaN}_3$ , и инкубировали 30 мин в присутствии и отсутствие 100 мкМ  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  при 30°C и 700 об/мин. Для остановки реакции добавляли 400 мкл 1 М  $\text{HClO}_4$ .

Затем проводили осаждение при 13000 g в течение 3 мин. Из надосадочной жидкости отбирали пробы и определяли содержание  $P_i$ .

Экстракцию полифосфатов проводили по методу Лангена и Лисса в модификации Кулаева и др. [Liss and Langen, 1959; Кулаев и др., 1960; Kulaev, 1979] и получали пять фракций полифосфатов: низкополимерную кислоторастворимую полиP1 (экстрагировали 0,5 н  $HClO_4$  при  $0^\circ C$ ), более высокополимерные - солерастворимую полиP2 (экстрагировали насыщенным раствором  $NaClO_4$  при  $0^\circ C$ ), первую и вторую щелочерастворимые фракции полиP3 и полиP4 (экстрагировали раствором  $NaOH$  pH 9-10 и 0,05 н  $NaOH$  pH 12 соответственно, при  $0^\circ C$ ), и фракцию полиP5, которая представляла собой горячий хлорнокислый экстракт. Фракцию полиP5 для электрофореза экстрагировали 30 mM ЭДТА при комнатной температуре в течение 1 ч.

Определение длины цепи полиP проводили с помощью электрофореза в 20% полиакриламидном геле, приготовленном на 200 mM Tris-боратном буфере, pH 8,3, с 7 M мочевиной. Пластины окрашивали толуидиновым голубым [Kumble and Kornberg, 1995]. Предварительно полиP всех фракций для концентрирования осаждали насыщенным раствором  $Ba(NO_3)_2$  и переводили в растворимую форму с помощью катионообменной смолы Dowex 50 WX 8 в  $NH_4^+$  форме.

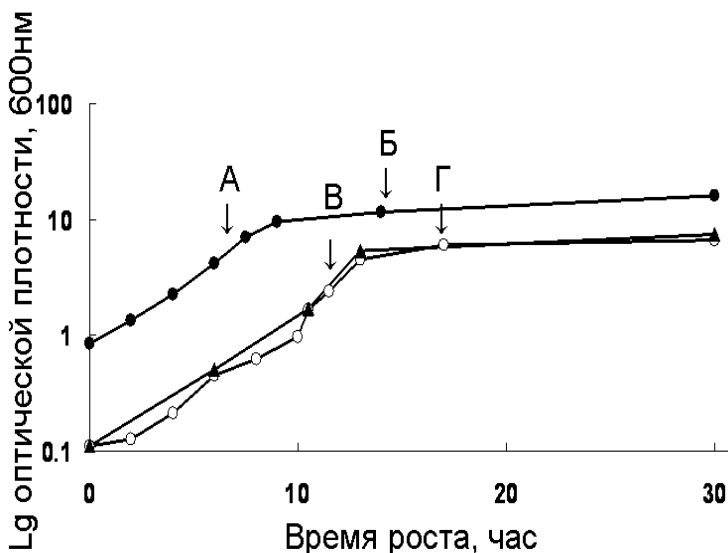
$P_i$  определяли следующим образом: к 145 мкл пробы добавляли 100 мкл реагента, приготовленного перед использованием (0,5 г аскорбиновой кислоты растворяли в 30 мл воды, добавляли 5 мл 12% раствора  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$  в 1 н  $H_2SO_4$  и 5 мл 10% SDS. Доводили объём водой до 50 мл). Реакцию проводили в планшетах для иммуноферментного анализа при  $30^\circ C$  в течение 10 мин на шейкере и затем измеряли оптическую плотность при 660 нм на фотометре "Эфос 9305" (Россия). Белок определяли по модифицированному методу Лоури [Bensadoun and Weinstein, 1976]. Определение образования  $\Delta pH$  на мембране изолированных вакуолей проводили с помощью гашения флуоресценции красителя 9-амино-6-хлор-2-метоксакридина на микрофлуориметре Hitachi (Япония).



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Влияние мутаций, нарушающих синтетазную функцию митохондриальной АТФазы, на особенности метаболизма полифосфатов в целых клетках и митохондриях *S. cerevisiae*

В работе были использованы штаммы *S. cerevisiae* D273 (родительский штамм), N417 и E232 (различные делеции в гене *ATP22*). У обоих мутантов подавлен синтез АТФ в митохондриях, наблюдается частичный дефицит цитохромов *a*, *a<sub>3</sub>* и *b*, понижена НАДН- и сукцинат-оксидазная активности, однако сохранена АТФазная активность [Helfenbein et al., 2003]. В отличие от родительского, мутантные штаммы не растут на среде с этанолом. В связи с этим культивирование проводили с использованием глюкозы как источника углерода. Штаммы с мутациями в гене *ATP22* росли медленнее и давали меньший выход биомассы, чем родительский (рис. 1). В связи с неспособностью к окислительному фосфорилированию они не демонстрировали диауксического роста.



**Рис. 1.** Кривые роста различных штаммов *S. cerevisiae* при культивировании на среде YPD

- – штамм D273,
- – штамм E232,
- ▲ – штамм N417

Для экстракции полиР использовали клетки конца логарифмической стадии роста - 7 ч для родительского штамма (рис. 1, точка А) и 12 ч для мутантных штаммов (рис. 1, точка В) и клетки стационарной стадии роста - 14 ч для родительского штамма (рис. 1, точка Б) и 17 ч для мутантных штаммов (рис. 1, точка Г). Данные по содержанию полиР различных фракций в клетках родительского (D273) и мутантного (E232) штаммов на двух стадиях роста на глюкозе представлены в таблице 1.

В клетках, находящихся на логарифмической стадии роста, содержание полиР различных фракций у мутанта было почти таким же, как у родительского штамма. Этот результат явился ожидаемым, так как на этой стадии роста основным источником энергии для клеток дрожжей является гликолиз, а окислительное фосфорилирование на уровне дыхательной цепи подавлено посредством механизма катаболитной репрессии [Meijer et al., 1998].

**Таблица 1.** Содержание полиР в клетках дрожжей *S. cerevisiae* D273 (родительский штамм) и E232 (штамм с нарушенным синтезом АТФ в митохондриях) на логарифмической и стационарной стадиях роста (мкмоль Р/г сырой биомассы), среда YPD с 10 мМ Р<sub>i</sub>.

Фракции полифосфатов	Штаммы дрожжей			
	D273, родительский штамм		E232, штамм с нарушенным синтезом АТФ в митохондриях	
	Логарифмическая стадия	Стационарная стадия	Логарифмическая стадия	Стационарная стадия
Р <sub>i</sub>	32 ±2,0	18 ±3,3	29 ±3,4	32 ±6,0
полиР1	6,9 ±0,7	32 ±5,0	6,4 ±0,6	13 ±2,8
полиР2	1,2 ±0,1	7 ±2,0	1 ±0,03	2,6 ±1,0
полиР3	2,6 ±0,6	12 ±2,0	2,3 ±0,2	4,5 ±1,0
полиР4	0,27 ±0,04	0,94 ±0,2	0,23 ±0,03	0,54 ±0,2
полиР5	0,69 ±0,05	0,93 ±0,3	0,42 ±0,07	0,79 ±0,2
Σ полиР	12,0 ±1,3	53,0 ±5,0	10,0 ±0,9	21,0 ±3,6

На стационарной стадии роста у обоих штаммов наблюдается увеличение содержания полиР, что характерно и для других штаммов *S. cerevisiae* [Вагабов и др., 1998]. Однако, если у родительского штамма суммарное содержание полиР увеличилось почти в 4 раза, то у мутанта только в 1,8 раза. В результате на стационарной стадии роста родительский штамм содержал в 2,5 раза больше полиР, чем мутантный. Эта разница в наибольшей степени выражена во фракциях полиР1, полиР2 и полиР3, которые наиболее динамичны и накапливаются в большем количестве, чем другие [Вагабов и др., 1998]. Таким образом, подтверждается существенная зависимость содержания именно этих фракций от энергетического состояния клетки дрожжей [Вагабов и др., 2008; Vagabov et al., 2008]. Штамм N417 с другой делецией в том же гене демонстрировал аналогичный эффект.

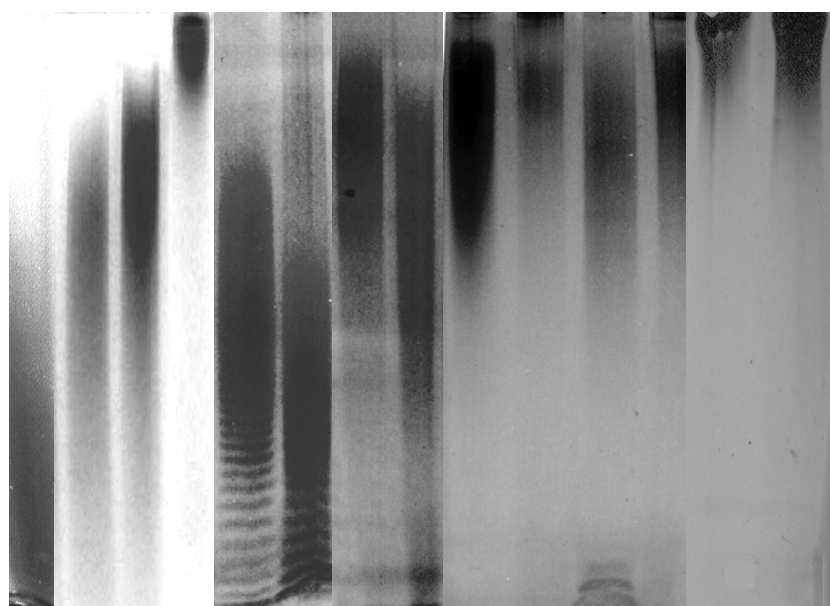
Содержание  $P_i$  на логарифмической стадии является практически одинаковым у штаммов D273 и E232. На стационарной стадии содержание  $P_i$  у родительского штамма уменьшается, что можно объяснить увеличением его резервированием  $P_i$  в виде полиР, тогда как у мутанта оно сохраняется на прежнем уровне.

Электрофорез полиР, полученных из клеток, находящихся на стационарной стадии роста, показал, что средняя длина цепи полиР во фракциях полиР1, полиР2 и полиР3 у мутантного штамма меньше, чем у родительского. Для остальных фракций различий в длине цепи между родительским штаммом и мутантом не обнаружено (рис. 2). Таким образом, у мутантного штамма наблюдается уменьшение длины цепи полиР тех фракций, для которых показано снижение их содержания по сравнению с родительским штаммом. Вероятно, уменьшение содержания и длины цепи полиР связано со снижением уровня их синтеза, из-за недостатка энергообеспечения клетки вследствие неспособности мутантов к окислительному фосфорилированию.

Известно, что при культивировании на глюкозе, митохондрии *S. cerevisiae*, а также функционально незрелые промитохондрии содержат полиР [Пестов, 2004].

Чтобы ответить на вопрос, связано ли содержание полиР в митохондриях с активностью АТФсинтетазы этих органелл, получили фракцию митохондрий из клеток штаммов D273 и N417, выращенных до стационарной стадии роста.

Гидролазная активность АТФазы митохондрий (табл. 2) у мутанта сохранена, что согласуется с литературными данными [Helfenbein et al., 2003]. У обоих штаммов азид натрия, известный ингибитор митохондриальной АТФазы, подавлял эту активность на 90%, что указывает на отсутствие примесей других органелл и мембран, содержащих АТФазы, в полученном препарате митохондрий. Экзополифосфатазная активность в изолированных митохондриях штаммов D273 и N417 сходна (табл. 2).



**Рис. 2. Электрофорез полифосфатов различных фракций, полученных из клеток *S. cerevisiae* на стационарной стадии роста. 1 – родительский штамм D273. 2 – штамм E232, мутантный по гену *ATP22*. 15,25,45,188 – полифосфаты-метчики со средней длиной цепи 15, 25, 45 и 188**

15 25 45 188 полиР1 полиР2 полиР3 полиР4 полиР5

В митохондриях мутанта выявлено лишь незначительное снижение содержания полиР (табл. 2), участие которых в метаболизме полиР в клетке требует дальнейших исследований. Таким образом, в отличие от целых клеток, во фракции митохондрий не найдено существенного влияния отсутствия АТФсинтазной активности на содержание полиР.

**Таблица 2.** Количество полиР и активность ферментов фосфорного метаболизма в изолированных митохондриях штаммов дрожжей D273 и N417

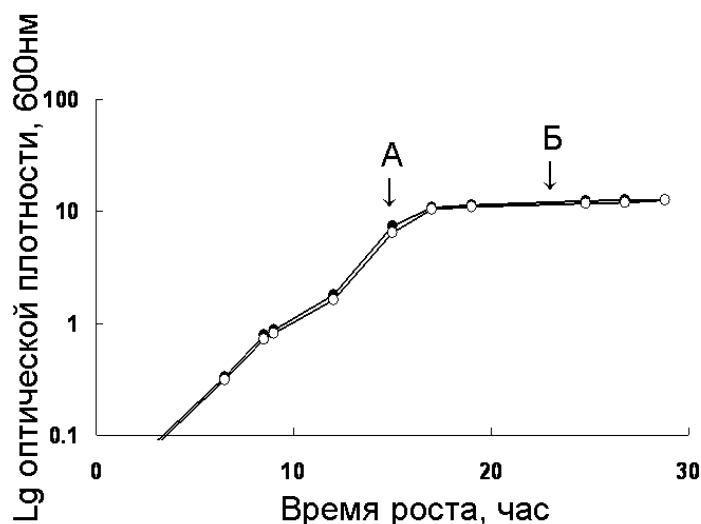
Штамм	АТФазная активность, Е/мг белка	Экзополифосфатазная активность, Е/мг белка	ПолиР, мкмоль Р/мг белка
D273, родительский	0,45 ±0,03	0,16 ±0,01	0,102 ±0,006
N417, мутантный	0,36 ±0,017	0,14 ±0,008	0,077 ±0,01

По-видимому, синтез полиР в митохондриях не связан с АТФ-синтетазной активностью. Можно предположить, что на мембране этих дефектных митохондрий всё же образуется некоторый потенциал, который может быть использован для синтеза полиР [Пестов, 2004]. С другой стороны, не исключено, что полиР митохондрий синтезируются в других компартментах клетки и потом транспортируются в эти органеллы. В настоящий момент вопрос о механизмах биосинтеза полиР в митохондриях не решен и требует дальнейших исследований.

Таким образом, мутация в гене *ATP22*, которая нарушает синтез АТФ в митохондриях, вызывает снижение способности клеток дрожжей накапливать полиР в стационарной стадии роста, в первую очередь, за счет кислоторастворимой фракции полиР1 и щелочерастворимой фракции полиР3. Это указывает на тесную взаимосвязь накопления полиР и способности клеток дрожжей к окислительному фосфорилированию на уровне дыхательной цепи. Взаимосвязь синтеза полифосфатов и образования АТФ в клетках дрожжей, по-видимому, не является прямой. Однако, имеется ряд данных, указывающих на возможность синтеза этих полимеров за счет электрохимического градиента на мембранах [Кулаев и др., 2005], образование которого на цитоплазматической и вакуолярной мембранах обеспечивается за счет энергии АТФ. Не исключено также существование дополнительных регуляторных механизмов, обеспечивающих зависимость синтеза полифосфатов от концентрации АТФ, поскольку для этого синтеза требуется большое количество энергии.

## 2. Влияние мутации в гене *PMA1*, снижающей активность $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны, на содержание и длину цепи полифосфатов различных фракций у *S. cerevisiae*

$H^+$ -АТФаза плазматической мембраны – жизненно важный фермент дрожжей. Мутации, приводящие к значительному нарушению его функции, летальны. Поэтому в качестве объекта исследования был выбран мутант Т850А (по гену *PMA1*, кодирующему эту АТФазу), у которого активность фермента снижена на 50%. Штамм с мутацией в гене *PMA1* не демонстрировал существенных отличий от родительского штамма по скорости роста и выходу биомассы (рис. 3). В таблице 3 представлены данные по активности плазматической  $H^+$ -АТФазы у родительского и мутантного штаммов *in situ*. У мутантного штамма эта активность снижена на ~50% как на стационарной, так и на логарифмической стадии роста. Снижение активности у обоих штаммов на стационарной стадии роста является характерным для данного фермента и связано с так называемым «глюкозным эффектом» [Petrov et al., 2000].



**Рис. 3. Кривые роста различных штаммов *S. cerevisiae* при культивировании на среде YPD.**  
 ● – родительский штамм NY13.  
 ○ – штамм Т850А

**Таблица 3.** Активность АТФазы плазматической мембраны штаммов дрожжей NY13 и T850A на логарифмической и стационарной стадиях роста.

Штаммы дрожжей	Активность АТФазы плазматической мембраны, Е/г сырой биомассы	
	Логарифмическая стадия роста	Стационарная стадия роста
NY13	46,6	33,4
T850A	26,0	16,7

Для экстракции полиР использовали клетки конца логарифмической стадии роста - 15 ч (рис. 3, точка А) и клетки стационарной стадии роста - 24 ч (рис. 3, точка Б). Данные по содержанию полиР в клетках родительского и мутантного штаммов представлены в таблице 4.

В клетках, находящихся на логарифмической стадии роста, содержание полиР различных фракций у мутанта было практически одинаковым с таковым у родительского штамма. На стационарной стадии общее содержание полиР также было одинаковым у обоих штаммов, однако произошло некоторое перераспределение между фракциями. Содержание полиР в кислоторастворимой фракции полиР1 у мутанта оказалось меньшим, чем у родительского штамма, а фракций полиР2 и полиР3, соответственно, - большим (табл. 4). Вопрос о том, чем обусловлено это перераспределение доли отдельных фракций в общем пуле полифосфатов, наблюдаемое у мутанта, может представлять интерес для дальнейших исследований.

Электрофорез полиР, полученных из клеток, находящихся на стационарной стадии роста, не выявил различий в длине цепи полиР между мутантным и родительским штаммом, и средняя длина цепи фракций соответствовала литературным данным. Таким образом, у мутанта в стационарной стадии роста возросло содержание более длинноцепочечных фракций, и соответственно уменьшилось содержание короткоцепочечных.

**Таблица 4.** Содержание полиР в клетках дрожжей *S. cerevisiae* NY13 и T850A на логарифмической и стационарной стадиях роста (мкмоль Р/г сырой биомассы), среда YPD с 10 мМ Р<sub>i</sub>.

Фракции полифосфатов	Штаммы дрожжей			
	NY13, родительский штамм		T850A, штамм с нарушением функционирования плазматической АТФазы	
	Логарифмическая стадия	Стационарная стадия	Логарифмическая стадия	Стационарная стадия
Р <sub>i</sub>	26,5 ±2,8	14,7 ±0,8	26,7 ±2,5	14 ±2,0
полиР1	29,4 ±1,7	25,3 ±2,4	22,35 ±1,6	15,8 ±1,0
полиР2	26,3 ±3,0	34 ±2,8	26,9 ±3,1	39 ±4,0
полиР3	15,25 ±0,8	19 ±2,1	13,2 ±0,6	24,9 ±2,5
полиР4	0,46 ±0,1	0,754 ±0,12	0,338 ±0,1	0,714 ±0,09
полиР5	1,6 ±0,2	2,5 ±0,21	1,54 ±0,18	2,6 ±0,3
ΣполиР2+полиР3	41,5	53	40,1	63,9
Σ полиР	73,0 ±6,0	82,0 ±7,8	64,0 ±5,2	83,0 ±8,1

Исходя из полученных данных, можно предположить, что функционирование Н<sup>+</sup>-АТФазы плазматической мембраны мало вовлечено в метаболизм полиР, независимо от стадии роста. Общее содержание полиР у обоих штаммов практически одинаково как на логарифмической, так и на стационарной стадиях. Более того, сопоставляя данные таблиц 3 и 4, можно видеть, что общее содержание полиР у обоих штаммов увеличивается на стационарной стадии роста по сравнению с логарифмической стадией, в то время как активность Н<sup>+</sup>-АТФазы плазматической мембраны, наоборот, снижается. Предположительно, Н<sup>+</sup>-АТФаза плазматической мембраны могла бы быть вовлечена в обмен полиР на двух уровнях: во-первых, за счет энергообеспечения поглощения Р<sub>i</sub> из среды, а во-вторых, за счет использования потенциала на плазматической мембране для биосинтеза полиР. Данные таблицы 4 показывают, что содержание Р<sub>i</sub> у мутантного штамма не отличается от родительского. Следует учесть, что в данных экспериментах мы использовали высокую концентрацию Р<sub>i</sub> в среде, при которой наблюдается в основном его пассивный



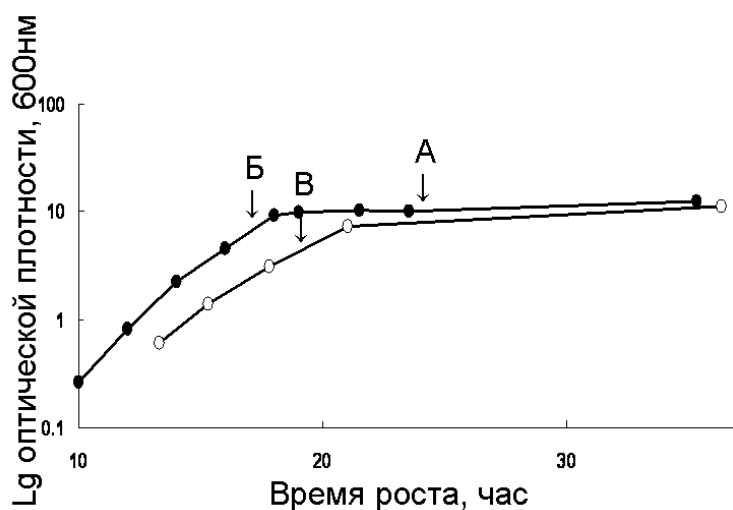
транспорт [Трилисенко и др., 2003]. Кроме того, вполне возможно, что 50% уровня активности АТФазы достаточно для обеспечения активного транспорта  $P_i$ .

### **3. Влияние мутации в гене *VMA2*, нарушающей протон-транслоцирующую активность вакуолярной $H^+$ -АТФазы, на особенности метаболизма полифосфатов у *S. cerevisiae* в условиях избытка и недостатка полиР**

Особый интерес представляет изучение особенностей метаболизма полиР у мутантов с нарушенной энергизацией вакуолярной мембраны. Это связано с обнаружением способности белка этой мембраны *Vtc4p* к синтезу полиР [Hothorn et al., 2009]. Мутанты по различным субъединицам V-АТФазы, фермента, обеспечивающего энергизацию вакуолярной мембраны, широко изучаются [Milgrom et al., 2007], однако влияние таких мутаций на метаболизм полиР ранее не исследовали.

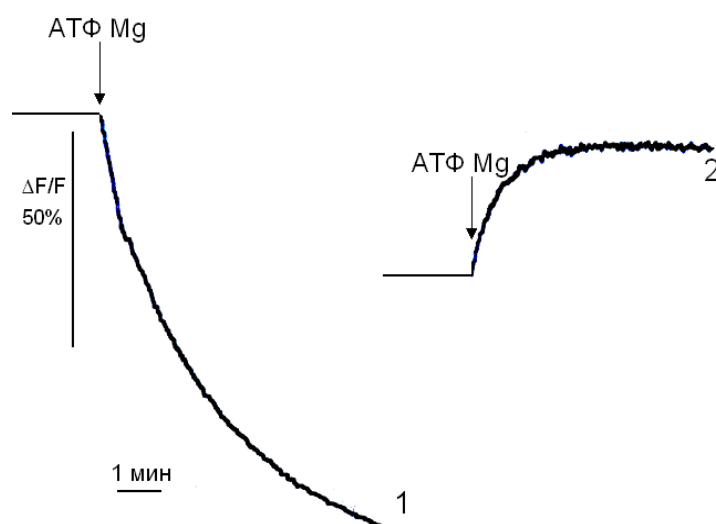
В данной части исследования использованы штаммы ВУ 4741 (родительский штамм) и ВУ 4741 *Vma2Δ* (мутант по гену *VMA2*, кодирующему белок *v* субъединицы *v1* домена вакуолярной АТФазы) [Kane, 2007]. Кривые роста штаммов *S. cerevisiae* приведены на рис. 4. Из клеток обоих штаммов были выделены вакуоли с помощью флотации в градиенте концентрации фикола и установлено, что у мутантного штамма нарушена способность вакуолярной АТФазы к образованию градиента ионов водорода на мембране этих органелл (рис. 5).

Для экстракции полиР использовали клетки стационарной стадии роста - 24 ч (рис. 4, точка А) для обоих штаммов, клетки стадии активного роста в условиях гиперкомпенсации полиР (кривая роста не показана). А так же клетки конца логарифмической стадии роста - 17 ч для родительского штамма (рис. 4, точка Б) и 19 ч для мутантного штамма (рис. 4, точка В).



**Рис. 4.** Кривые роста различных штаммов *S. cerevisiae* при культивировании на среде YPD.

● – штамм BY 4741,  
○ – штамм BY 4741 Vma2Δ



**Рис. 5.** Образование  $\Delta pH$  на мембране изолированных вакуолей различных штаммов *S. cerevisiae*. Измерения проводили по гашению флуоресценции 9-амино-6-хлор-2-метоксакридина в 10 мМ MES-NaOH, pH 7,2, содержавшем 2 мМ  $MgSO_4$ . Реакцию начинали добавлением 2 мМ MgATФ, 1 – вакуоли из клеток родительского штамма, 2 – вакуоли из клеток штамма Vma2Δ

Данные по содержанию  $P_i$  и полиР в клетках родительского и мутантного штамма на стационарной стадии роста представлены в таблице 5. Родительский штамм содержал в 1,5 раза больше  $P_i$  и в 5 раз больше полиР, чем мутантный. Таким образом, в отличие от предыдущих пар мутант-родитель, здесь наблюдается снижение содержания  $P_i$  в клетках мутанта. Содержание полиР1 и полиР3 у мутанта по сравнению с родительским штаммом оказалось меньше более чем в 5 раз, полиР2 – в 10 раз. Содержание фракции полиР4 у обоих штаммов было практически одинаковым, что согласуется с представлением о том, что эта фракция локализована в

клеточной оболочке и пути ее метаболизма отличаются от таковых для других фракций [Вагабов и др., 2000].

**Таблица 5.** Содержание полиР в клетках дрожжей *S. cerevisiae* ВУ 4741 и ВУ 4741 *Vma2Δ* на стационарной стадии роста (мкмоль Р/г сырой биомассы), среда YPD с 10 мМ Р<sub>i</sub>.

Фракции полифосфатов	Штаммы дрожжей	
	ВУ 4741, родительский штамм	ВУ 4741 <i>Vma2Δ</i> , штамм с нарушением функционирования вакуолярной АТФазы
Р <sub>i</sub>	16,3 ±3,0	10,4 ±1,4
полиР1	76 ±10,0	14 ±1,5
полиР2	19 ±3,0	1,8 ±0,14
полиР3	19 ±3,0	3,6 ±0,4
полиР4	2,6 ±0,3	2,4 ±0,3
полиР5	0,77 ±0,1	0,51 ±0,02
Σ полиР	118,0 ±10,0	23,0 ±3,0

Таким образом, содержание полиР отдельных фракций сократилось при данной мутации в неодинаковой степени. Наиболее стабильными и независимыми от функционирования вакуолярной Н<sup>+</sup>-АТФазы оказались фракции полиР1 и полиР4, а также фракция полиР5, которая характеризуется низким уровнем в наших экспериментах.

Электрофорез показал что средняя длина цепи полиР1 у мутантного и родительского штаммов составляла ~15 фосфатных остатков, что сходно с другими штаммами дрожжей [Vagabov et al., 2008]. Средняя длина цепи полиР2 также была ~15 фосфатных остаток у обоих штаммов. Средняя длина полиР3 у родительского штамма составила 45-75, а у мутанта 15-30 фосфатных остатков.

Учитывая, что содержание полиР у мутанта на логарифмической стадии роста оказалось весьма низким и неудобным для анализа, для изучения влияния мутации в гене *VMA2* на содержание полиР на стадии активного роста мы выбрали условия

гиперкомпенсации полиР, для которых характерно значительное увеличение содержания полиР. Мутация не препятствовала расходованию полиР при культивировании на среде с дефицитом  $P_i$ . (табл. 6). В результате и содержание  $P_i$  и содержание полиР стало близким у обоих штаммов.

**Таблица 6.** Содержание полиР в клетках дрожжей *S. cerevisiae* ВУ 4741 и ВУ 4741 *Vma2Δ* при культивировании в условиях голодания по фосфору, гиперкомпенсации полиР в течение 1 ч (мкмоль Р/г сырой биомассы)

Фракции полифосфатов	Штаммы дрожжей			
	ВУ 4741		ВУ 4741 <i>Vma2Δ</i>	
	Дефицит $P_i$	Гиперкомпенсация	Дефицит $P_i$	Гиперкомпенсация
$P_i$	9,63 ±1,0	25,4 ±2,7	9,06 ±0,8	18,6 ±2,0
полиР1	1,27 ±0,15	36,4 ±3,4	0,19 ±0,02	18,4 ±1,7
полиР2	7,51 ±0,8	40,8 ±3,7	5,28 ±0,48	3,65 ±0,4
полиР3	2,89 ±0,3	23,7 ±2,1	2,25 ±0,24	5,52 ±0,6
полиР4	1,56 ±0,17	5,12 ±0,55	1,61 ±0,18	3,24 ±0,34
полиР5	0,894 ±0,1	0,3 ±0,02	0,515 ±0,06	0,544 ±0,064
Σ полиР	14,1 ±1,5	106,3 ±9,7	9,84 ±1,0	31,3 ±0,28

После переноса клеток, голодавших по  $P_i$ , на полноценную среду, накопление полиР происходило в клетках обоих штаммов. Суммарное накопление полиР в этих условиях у мутанта оказалось более чем в 3 раза меньшим, чем у родительского штамма. У мутанта, в отличие от родительского штамма, на стадии активного роста существенно накапливалась только фракция полиР1, в то время как содержание полиР2 даже уменьшалось, а содержание остальных фракций возрастало незначительно.

Таким образом, мутация в гене *VMA2*, которая приводит к отсутствию электрохимического градиента ионов водорода на вакуолярной мембране, вызывает значительное снижение способности клеток дрожжей накапливать полиР как на стационарной стадии роста, так и на стадии активного роста. Это указывает на

взаимосвязь синтеза этих полимеров и энергизации вакуолярной мембраны. Полученные данные позволяют предположить, что в наибольшей степени с состоянием энергетики вакуолярной мембраны связано накопление полиР фракций полиР3 и полиР2. Но в клетке, по-видимому, существует независимая от электрохимического градиента  $H^+$  на вакуолярной мембране система синтеза полиР, которая в первую очередь ответственна за накопление короткоцепочечных полиР1. Для уточнения того, зависит ли синтез полиР1 от электрохимических градиентов на других мембранах, было изучено влияние протонофора FCCP на их накопление. В условиях гиперкомпенсации FCCP (10 мкМ) подавлял накопление полиР1 у мутанта на 50%, а у родительского штамма на 30%. Можно предположить, что, по крайней мере часть полиР1 синтезируется независимо от электрохимического потенциала ионов  $H^+$  не только на вакуолярной, но и на других мембранах.

### Заключение

В таблице 7 приведены сравнительные данные о влиянии мутаций, нарушающих функционирование основных протонных АТФаз дрожжей *S. cerevisiae* (митохондриальной АТФазы,  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны,  $H^+$ -АТФазы вакуолей) на суммарное содержание  $P_i$  и полиР в клетках *S. cerevisiae*. Можно заключить, что наблюдаемые изменения в содержании полиР не связаны с недостатком содержания  $P_i$  в клетках.

Наиболее значительные нарушения в обмене полиР обнаружены при мутации, приводящей к деэнергизации вакуолярной мембраны, что свидетельствует о значительной роли этих органелл в биосинтезе полиР у дрожжей. В то же время, полученные данные свидетельствуют о существовании у дрожжей систем синтеза полиР, не связанных с электрохимическим потенциалом как на вакуолярной, так и на других мембранах и ответственной в первую очередь за синтез низкомолекулярных полифосфатов.

**Таблица 7.** Общее содержание полифосфатов и ортофосфата мутантных штаммов в процентах от значения у соответствующего родительского штамма на логарифмической и стационарной стадиях роста.

Штаммы	Σ полиР и Рi мутантных штаммов в % от значения у соответствующего родительского штамма			
	Логарифмическая стадия роста		Стационарная стадия роста	
	Σ полиР	Рi	Σ полиР	Рi
Е232 штамм с нарушенным синтезом АТФ в митохондриях	83%	91%	40%	170%
Т850А штамм с нарушением функционирования плазматической Н <sup>+</sup> -АТФазы	88%	100%	100%	100%
ВУ 4741 Vma2Δ штамм с нарушением функционирования вакуолярной Н <sup>+</sup> -АТФазы	30%	73%	20%	64%

## Выводы

1. Нарушение синтетазной функции АТФазы митохондрий *Saccharomyces cerevisiae*, вызванное мутацией в гене *ATP22*, приводит к снижению содержания и длины цепи неорганических полифосфатов в целых клетках на стационарной стадии роста по сравнению с родительским штаммом, в первую очередь за счет кислоторастворимой фракции и первой щелочерастворимой фракции, что указывает на возможную роль окислительного фосфорилирования на уровне дыхательной цепи в накоплении этих фракций.
2. Содержания полифосфатов в митохондриях *Saccharomyces cerevisiae* мало зависит от мутаций, нарушающих функционирование митохондриальной АТФ-синтетазы.
3. Мутация в гене *PMA1*, вызывающая снижение активности  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны вдвое, не оказывает выраженного влияния на содержание и длину цепи полифосфатов различных фракции в клетках *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Нарушение протон-транслоцирующей активности вакуолярной  $H^+$ -АТФазы, вызванное мутацией в гене *VMA2*, приводит к значительному снижению накопления и длины цепи полифосфатов в клетках *Saccharomyces cerevisiae* независимо от стадии роста и содержания фосфата в среде, что свидетельствует о важной роли энергизации вакуолярной мембраны в накоплении этих полимеров.
5. Мутация, нарушающая энергизацию вакуолярной мембраны, по-разному влияет на содержание полифосфатов отдельных фракций: не сказывается на содержании щелочерастворимой фракции полиР4, локализованной в клеточной оболочке, приводит к уменьшению содержания солерастворимой фракции полиР2 и щелочерастворимая фракция полиР3 до уровня, наблюдаемого при фосфорном голодании, а накопление фракции полиР1 сохраняется, хотя в меньшей степени относительно родительского штамма.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. А.А. Томашевский, Л.П. Рязанова, Т.В. Кулаковская И.С. Кулаев.. Неорганические полифосфаты у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при мутации, нарушающей функции АТФазы вакуолей. *Биохимия*, 2010, Т. 75, №8, С. 1052-1054
2. А.А. Томашевский, Л.П. Рязанова, Т.В. Кулаковская, И.С. Кулаев. Неорганические полифосфаты различных фракций у мутантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с нарушенным синтезом АТФ в митохондриях. *Микробиология*, 2010, Т. 79, №1, С. 30-33
3. Кулаковская Т.В., Вагабов В.М., Томашевский А.А., Бреус Н.А., Кулаев И.С. Неорганические полифосфаты в регуляции фосфорного и энергетического метаболизма у дрожжей. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2010, №1, С. 24-25
4. Томашевский А.А. Неорганические полифосфаты различных фракций у мутантов дрожжей *Saccharomices cerevisiae*, дефектных по АТФазам митохондрий и вакуолей. Биология-наука 21<sup>-го</sup> века (Тезисы докладов. 13<sup>-я</sup> Пущинская конференция молодых ученых). Пущино. 2009. С. 84.
5. Томашевский А.А. Неорганические полифосфаты различных фракций у мутантов дрожжей *Saccharomices cerevisiae*, дефектных по АТФазе вакуолей. Биология-наука 21<sup>-го</sup> века (Тезисы докладов. 14<sup>-я</sup> Пущинская конференция молодых ученых). Пущино. 2010. С. 63.
6. Alexander A. Tomashevsky, Valery V. Petrov. Point mutation in M9-M10 loop of the yeast Pma1 H<sup>+</sup>-ATPase affects both ATPase functioning and polyphosphate (PolyP) distribution. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2011, V. 28, P. 1025-1026.