

УДК 577.152.313

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ПОЛИФОСФАТЫ И ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae* ПРИ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА *PPN2*

© 2020 Л.П. Рязанова¹, Л.А. Ледова¹, Н.А. Андреева¹, А.Н. Звонарев¹,
М.А. Эльдаров², Т.В. Кулаковская^{1*}

¹ Пушчинский научный центр биологических исследований,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
142290 Пушкино Московской обл., Россия; электронная почта: alla@ibpm.pushchino.ru

² ФИЦ биотехнологии, Институт биоинженерии РАН, 117312 Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.01.2020

После доработки 15.02.2020

Принята к публикации 17.02.2020

Исследовано влияние сверхпродукции дрожжевой эндополифосфатазы Ppn2 на метаболизм неорганических полифосфатов у *Saccharomyces cerevisiae*. Экспрессия гена *PPN2* в дрожжах под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*PKG1*) приводила к значительному повышению эндополифосфатазной активности, стимулируемой ионами кобальта/цинка. Эта активность была более выражена с длинноцепочечными полифосфатами, стимулировалась АДФ и присутствовала как в растворимой, так и грубой мембранной фракциях. Содержание короткоцепочечных полифосфатов в клетках штамма-трансформанта увеличилось в ~2,5 раза по сравнению с родительским штаммом. Штамм с сверхэкспрессией Ppn2 более устойчив к перекиси и щелочи. Обсуждается роль короткоцепочечных полифосфатов в адаптации к этим неблагоприятным факторам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полифосфат, полифосфатаза, ген *PPN2*, сверхэкспрессия, *Saccharomyces cerevisiae*.

DOI: 10.31857/S0320972520040120

Неорганические полифосфаты (полиР), линейные полимеры ортофосфорной кислоты, представляют собой регуляторные биополимеры, которые присутствуют в клетках как прокариот, так и эукариот [1–4]. Система деградации полиР у дрожжей состоит из нескольких ферментов, различающихся по своей локализации, физико-химическим свойствам и функциональному значению [5–10]. Эти ферменты различаются по преобладанию экзополифосфатазной или эндополифосфатазной активностей, благодаря чему по-разному воздействуют на полиР. Экзополифосфатаза (полифосфат фосфогидролаза, КФ 3.6.1.11) отщепляет Р с конца полимерной цепи, а эндополифосфатаза (полифосфат деполимераза, КФ 3.6.1.10.) расщепляет длинноцепочечные полиР на более короткоцепочечные, вплоть до триполифосфата. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* известны четыре белка, обладающих полифосфатазной активностью: Ppx1 [5, 6], Ppn1 [7, 8], Ddp1 [9] и Ppn2 [10]. Эти белки характеризуются разным соот-

ношением экзо- и эндополифосфатазной активности [11], не имеют сходства по аминокислотной последовательности и относятся к разным семействам, согласно базам данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) и SGD (<https://www.yeastgenome.org/>). Известно, что клетки двойного нокаут-мутанта по генам *PPX1* и *PPN1* способны использовать свои полиР для роста при голодании по фосфату [12]. Следовательно, Ddp1 и Ppn2 способны компенсировать отсутствие двух других полифосфатаз. В связи с такой мультикомпонентностью и возможной взаимозаменяемостью в системе катаболизма полиР у дрожжей, использование нокаут-мутантов по каждому из генов, кодирующих полифосфатазы, не достаточно для изучения функций этих ферментов. Еще одним подходом, позволяющим судить о функциональном значении отдельных полифосфатаз, является получение штаммов, сверхэкспрессирующих эти ферменты. Используя данный подход, мы показали, что сверхэкспрессия Ppx1 не влияет на длину цепи и количество полиР [13], сверхэкспрессия Ppn1 [14] и Ddp1 [15] приводит к изменениям в количестве и длине цепи полиР, в сверхэкспрессии Ppn1 влияет на стрессовые ответы [16]. Эндопо-

Принятые сокращения: полиР – неорганические полифосфаты.

* Адресат для корреспонденции.

лифосфатаза *Prn2* открыта относительно недавно [10] и предполагается, что основная ее функция – это деполимеризация полиР в вакуолях, где локализован этот фермент.

Целью настоящей работы была оценка влияния сверхэкспрессии гена *PPN2* на метаболизм полифосфатов и устойчивость к некоторым видам стресса у *S. cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы дрожжей. Штамм CRN с инактивированным геном *PPN1* (*MATa ade2 his3 ura3 ppn1Δ::CgTRP1*) [7] использовали в качестве родительского штамма. Применение штамма, дефектного по гену *PPN1*, связано с тем, что штамм дикого типа при попытках ввести в него векторы, содержащие гены полифосфатаз, имел очень слабую жизнеспособность. Штамм CRN/*PPN2*, сверхэкспрессирующий ген *PPN2* (*MATa ade2 his3 ura3 ppn1Δ::CgTRP1 pMB1_PPN2 Sc*), получали согласно методу, подробно описанному ранее [14]. Создание экспрессионного вектора *pMB1* с «кассетой экспрессии», состоявшей из сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*PKG1*) и терминатора фосфосфоглицераткиназы (*TDH*) *S. cerevisiae*, описано в той же работе [14].

Конструирование вектора экспрессии гена *PPN2*. Кодирующую последовательность гена *PPN2* получали методом ПЦР на матрице геномной ДНК штамма CRN с помощью Phuzion ДНК полимеразы («New England Biolabs», США) и праймеров *PPN2_F* (5'-GGACATGTCTGAAGATAAGCGGAAAAGACGAG-3') и *PPN2_R* (5'-GGTCTCGAGTGTTTTAAGAGCATGTACTTGAATTA-3'). Праймеры выбирали с помощью сервиса PrimerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) на основании референсной последовательности гена *YNL217W* (Genbank ID NM_001183055.1). К последовательностям добавляли 5'-фланкирующие сайты *PciI* и *XhoI*. Полученный ПЦР фрагмент размером 1 т.п.н. после гидролиза *PciI* и *XhoI* встраивали в *NcoI/XhoI* вектор *pMB1g*. После проверки секвенированием препараты плазмидной ДНК с «корректными» вставками использовали для трансформации реципиентного штамма CRN методом электропорации. Отобранные на среде SD прототрофные по урацилу трансформанты проверяли дополнительно методом ПЦР на наличие вектора.

Условия культивирования. Штамм CRN подерживали на агаризованной синтетической минимальной среде YNB с добавлением урацила, а трансформант CRN/*PPN2* – на агаризо-

ванной синтетической минимальной среде YNB без урацила [14]. Среда содержала на 1 л: 6,7 г бакто-дрожжевых азотистых оснований («Difco», США), 20 г глюкозы, по 20 мг L-триптофана, L-гистидина, L-метионина и аденина и 60 мг L-лейцина. При выращивании штамма CRN дополнительно вносили урацил в концентрации 20 мг/л.

Для получения биомассы культуры выращивали при 29 °С на качалке при 145 об/мин до стационарной стадии роста в колбах с 200 мл среды YNB с урацилом и без урацила для штаммов CRN и CRN/*PPN2* соответственно. Затем пересевали на такие же среды, для посева брали аликвоты культуры с одинаковой концентрацией клеток. Эти культуры использовали для получения кривых роста, а клетки на стационарной стадии роста – для определения чувствительности к токсикантам и получения образцов биомассы для анализа. Кривые роста строили по оптической плотности при 595 нм в кюветах с толщиной оптического пути 0,3 см на спектрофотометре «Unico» (США). Концентрацию клеток в стационарной стадии роста оценивали с помощью подсчета в камере Горяева, а количество мертвых клеток – с помощью окраски пропидий йодидом и подсчета доли окрашенных клеток при флуоресцентной микроскопии.

Биомассу собирали центрифугированием при 4000 г, дважды промывали холодной дистиллированной водой.

Получение сферопластов и препаратов, содержащих *Prn2*. Для получения сферопластов биомассу промывали 0,8 М раствором маннита в 5%-ном цитратном буфере, pH 6,5, инкубировали в этом же буфере с лиофилизированным желудочным соком виноградных улиток (150 мг на 1 г биомассы) и дитиотреитолом (10 мг на 1 г биомассы) в течение 2 ч при 30 °С. Сферопласты промывали тем же буфером и разрушали при 4 °С в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в 50 мМ Tris-HCl, pH 7,2, и 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторид («Sigma», США). Затем центрифугировали при 5000 г в течение 5 мин, к осадку снова добавляли этот же буфер и обрабатывали в гомогенизаторе. Затем центрифугировали при тех же условиях. Объединенный супернатант центрифугировали при 13 000 г в течение 60 мин. Супернатант представлял собой бесклеточный экстракт, а осадок – грубую мембранную фракцию.

Для определения влияния двухвалентных катионов, ADP и ATP, а также эндополифосфатазной активности с полиР разной степени полимерности использовали препарат бесклеточного экстракта после высаливания при 85%-ном

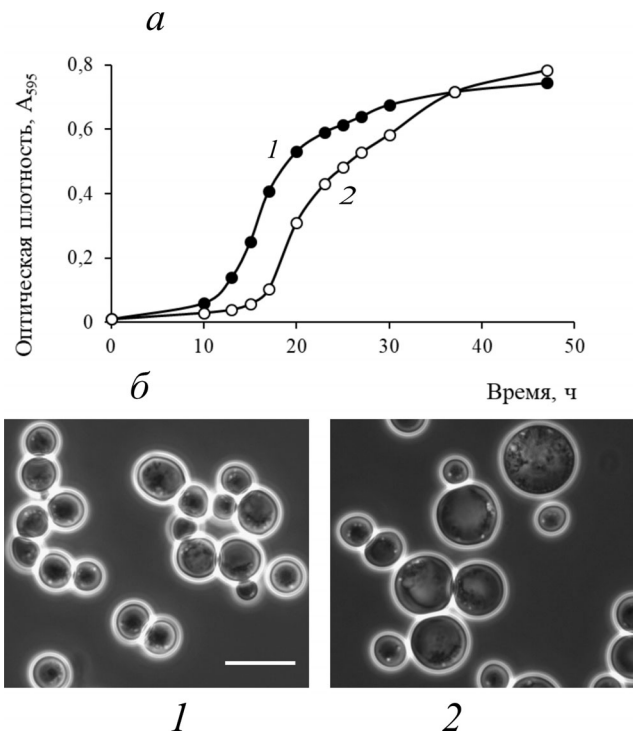


Рис. 1. *a* – Кривые роста штаммов CRN (1) и CRN/PPN2 (2) на среде YNB; *б* – микрофотографии (фазовый контраст) клеток родительского штамма CRN и штамма CRN/PPN2, выращенных в течение 36 ч на среде YNB, метка – 10 мкм. Представлены средние значения трех биологических повторностей.

насыщении сульфатом аммония. Сульфат аммония добавляли к бесклеточному экстракту до 50%-ного насыщения, выдерживали в течение 1 ч, затем удаляли балластные белки центрифугированием при 13 000 g 20 мин. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 85%-ного насыщения, выдерживали в течение 20 ч на холоду, затем осаждали при 14 000 g 1 ч и перерастворяли осадок в 25 mM Tris-HCl, pH 7,2, содержащем 0,1%-ный Triton X-100.

Определение полифосфатазных активностей.

Экзополифосфатазную активность определяли при 30 °C по скорости образования P [5]. Инкубационная среда содержала 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 2,5 mM MgSO₄ и 200 mM NH₄Cl. В качестве субстратов использовали 2,5 mM полиP со средней длиной цепи 188 фосфатных остатков (полиP₁₈₈) или 15 фосфатных остатков (полиP₁₅) («Monsanto», США). Концентрация полиP указана в соответствии с количеством P, образующимся при гидролизе полимера в 1 M HCl при 100° за 10 мин. ПолиP предварительно очищали от примесей пирофосфата и ортофосфата как описано ранее [5]. За единицу активности (Е) в случае экзополифосфатазной активности принимали количество фермента, образующего

1 мкмоль P за 1 мин. Концентрацию белка определяли с использованием БСА в качестве стандарта [17].

Эндополифосфатазную активность анализировали по уменьшению длины цепи полифосфатов (полиP₁₈₈ и полиP₁₅). Инкубационная среда (0,5–1 мл) содержала 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 200 mM NH₄Cl, 0,01–0,1 mM ZnCl₂, 2,5 mM, 9 mM полиP₁₈₈ либо 6,8 mM полиP₁₅. Время инкубации составляло 30 мин. Реакцию останавливали добавлением HClO₄ до концентрации 0,5 M. Дальнейшую подготовку образцов и электрофорез в 24%-ном ПААГ с 7 M мочевиной проводили как описано ранее [8].

Определение содержания полифосфатов в клетках. Для экстракции полиP применяли известный метод [18] с небольшими модификациями. Кислоторастворимую фракцию полиP получали двукратной обработкой биомассы 0,5 N HClO₄ при 0 °C в течение 15 мин при перемешивании. После отделения супернатанта оставшу-

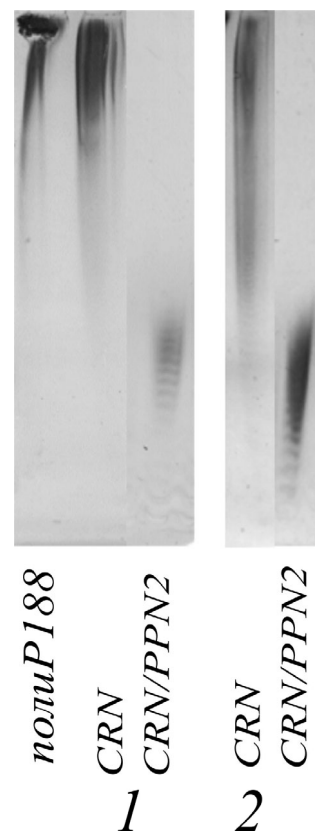


Рис. 2. Эндополифосфатазная активность в грубой мембранной фракции (1) и бесклеточном экстракте (2) штаммов CRN и CRN/PPN2. Активность определяли с использованием полиP₁₈₈ в качестве субстрата в присутствии 1 mM Zn²⁺. Содержание белка в образцах: 40 мкг (мембранная фракция CRN), 4 мкг (мембранная фракция, CRN/PPN2), 150 мкг (растворимая фракция, CRN), 13 мкг (растворимая фракция CRN/PPN2). Представлен результат двух биологических повторностей

юся биомассу дважды обрабатывали насыщенным раствором NaClO_4 при 0°C , супернатант после центрифугирования представлял собой солерастворимую фракцию полиР. Осадок обрабатывали дважды $0,05\text{ M NaOH}$, супернатант представлял собой щелочерастворимую фракцию. В полученных фракциях содержание полиР оценивали по лабильному фосфору. Количество оставшихся в биомассе кислотонерастворимых полифосфатов оценивали по содержанию Р после обработки биомассы $0,5\text{ N HClO}_4$ при 100°C в течение 20 мин. Количество Р определяли колориметрически [19].

Определение чувствительности штаммов к перекиси, щелочи, ионам кадмия. Чувствительность к Cd^{2+} , щелочи и перекиси определяли с помощью культивирования в планшетах на среде YPD, поскольку в среде YNB при добавлении этих реагентов выпадал осадок. Образцы культур, стандартизованных по концентрации клеток, добавляли в ячейки стерильного планшета с

крышкой, содержавшие среду YPD и аликвоты стерильного раствора $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, перекиси или KOH. После 24 ч культивирования оптическую плотность культур измеряли с помощью планшетного фотометра «Эфос» (Россия) при длине волны 600 нм.

Статистическая обработка. Все эксперименты повторяли трижды. На рисунках представлены средние значения со стандартным отклонением, полученные с помощью программы Excel. Электрофореграммы повторяли дважды, на рисунках представлены лучшие результаты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие у штамма CRN/PPN2 экспрессионного вектора, содержащего ген *PPN2*, приводило к изменению характера роста на минимальной среде по сравнению с исходным штаммом (рис. 1, а), скорость роста в логарифмической

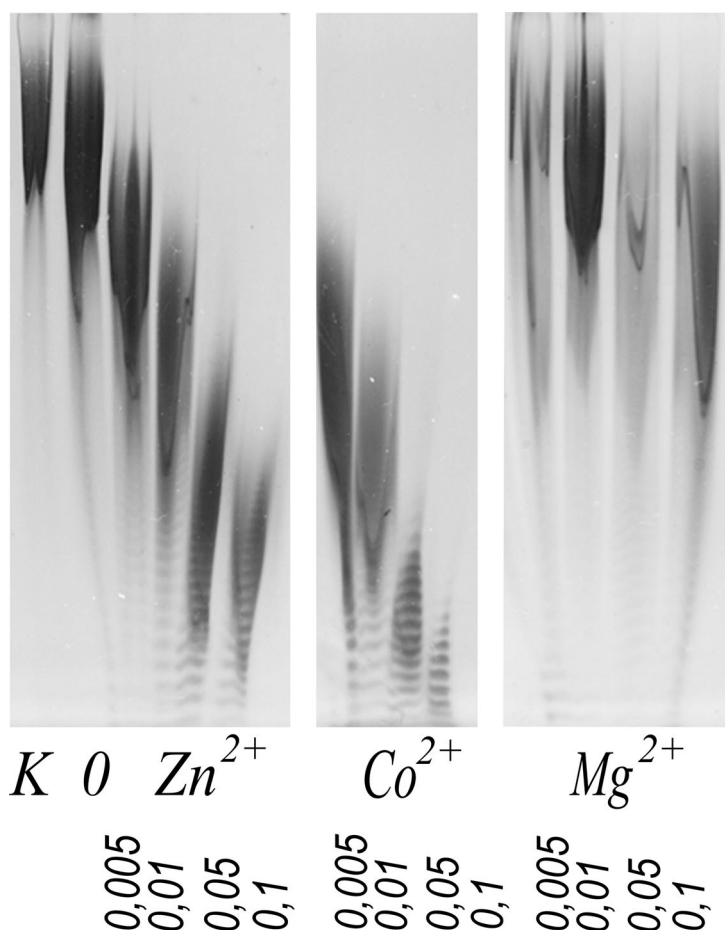


Рис. 3. Влияние двухвалентных катионов на эндополифосфатазную активность бесклеточного экстракта штамма CRN/PPN2 (препарат, полученный с помощью высаливания сульфатом аммония) с полиР₁₈₈ (9 мМ), в присутствии 200 мМ NH_4Cl , время инкубации 30 мин. *K* – контроль, без препарата белка, *0* – в отсутствии двухвалентных катионов, цифрами указаны концентрации двухвалентных катионов в мМ. Представлен результат двух биологических повторностей

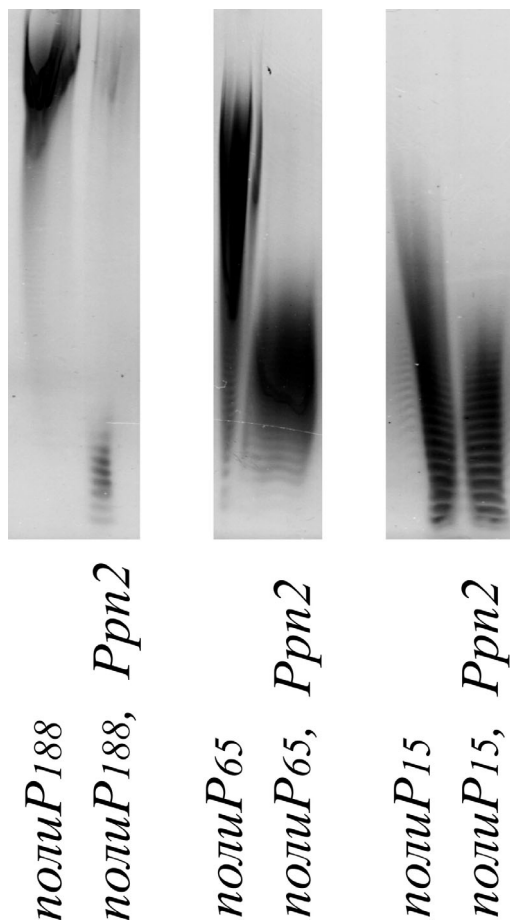


Рис. 4. Эндополифосфатазная активность бесклеточного экстракта CRN/PPN2 (препарат, полученный с помощью высаливания сульфатом аммония) с полиР различной степени полимерности, в инкубационной среде присутствовал $0,05 \text{ мМ Co}^{2+}$ и $200 \text{ мМ NH}_4\text{Cl}$. ПолиР₁₈₈, полиР₆₅, полиР₁₅ – полиР со средней длиной цепи 188, 65 и 15 фосфатных остатков инкубировали в отсутствие препарата Ррп2. Представлен результат двух биологических повторностей

стадии была снижена ($0,28 \text{ ч}^{-1}$) по сравнению с родительским штаммом CRN ($0,376 \text{ ч}^{-1}$). Однако на стационарной стадии роста количество сырой биомассы, оптическая плотность культуры (рис. 1, *а*) и концентрация клеток у обоих штаммов становились близкими. В популяции штамма CRN/PPN2 присутствовало много клеток увеличенного размера и измененной формы (рис. 1, *б*). По-видимому, увеличение размера клеток объясняет изменение соотношения между величинами сухой и сырой биомассы: 1 г сухой биомассы соответствовал 4,9 и 5,7 г сырой биомассы для клеток штаммов CRN и CRN/PPN2 соответственно. Оценку количества мертвых клеток на стационарной стадии роста у обоих штаммов проводили с помощью окраски пропидий йодидом, оно оказалось близким и не превышало 5–7%.

Известно, что Ррп2 проявляет эндополифосфатазную активность [6]. Проведено сравнение эндополифосфатазной активности бесклеточного экстракта и грубой мембранной фракции исходного штамма CRN, и штамма CRN/PPN2 в присутствии 1 мМ Zn^{2+} , оценивая их по уменьшению длины цепи полиР₁₈₈. У исходного штамма CRN отсутствует эндополифосфатаза Ррп1 [7], но имеется фермент Ddp1, проявляющий эндополифосфатазную активность. Эндополифосфатазная активность как в бесклеточном экстракте, так и в грубой мембранной фракции сверхпродуцента Ррп2 ожидаемо увеличилась (рис. 2). Отметим, что в норме фермент Ррп2 локализуется в вакуолях, тогда как у сверхпродуцента Ррп2 наблюдается появление его в растворимой форме. Подобный эффект наблюдали для штамма, сверхэкспрессирующего полифосфатазу Ррп1 под конт-

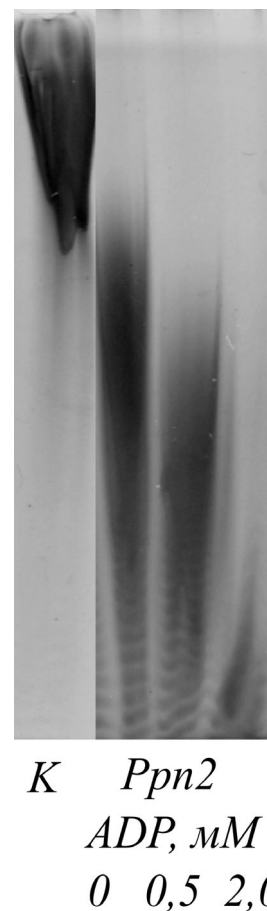


Рис. 5. Влияние ADP на эндополифосфатазную активность бесклеточного экстракта CRN/PPN2 PPN2 (препарат, полученный с помощью высаливания сульфатом аммония) с полиР₁₈₈ в присутствии $200 \text{ мМ NH}_4\text{Cl}$ и $0,05 \text{ мМ CoSO}_4$, время инкубации 30 мин. *К* – контроль, препарат Ррп2 не добавлен, Ррп2 – препарат добавлен. Представлен результат двух биологических повторностей

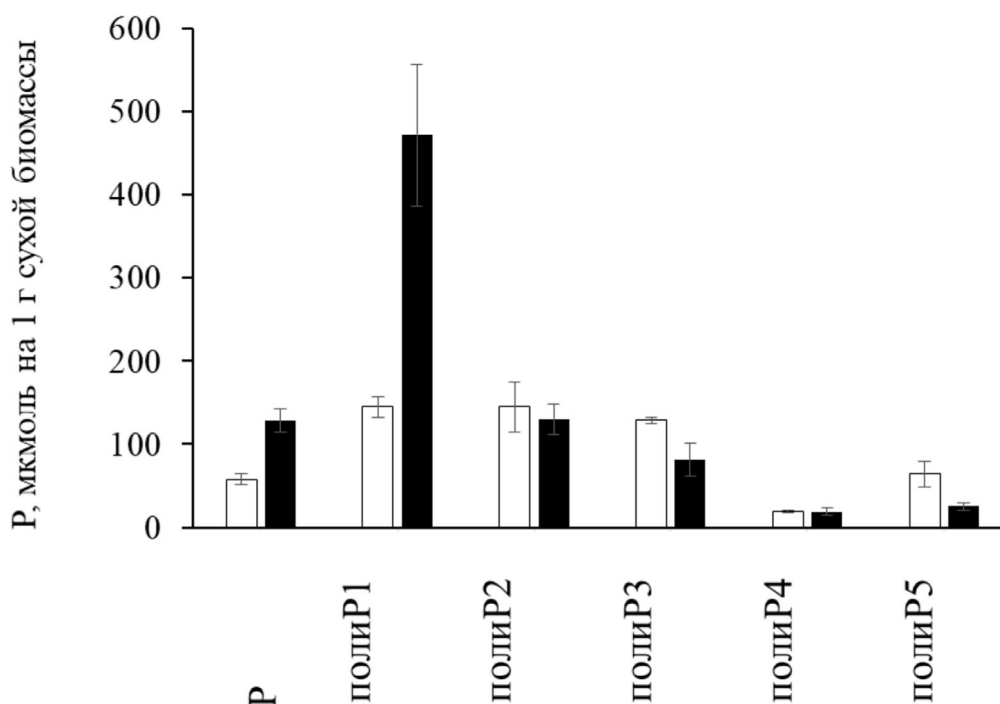


Рис. 6. Содержание ортофосфата (P) и полиР различных фракций в клетках штаммов *S. cerevisiae* CRN (белые столбцы) и CRN/PPN2 (черные столбцы) на стационарной стадии роста. Представлены средние значения трех биологических повторностей

ролем того же вектора, содержащего ген *PPN1* [20].

Мы изучили некоторые свойства эндополифосфатазной активности бесклеточного экстракта штамма CRN/PPN2, используя препарат, полученный из растворимой фракции после осаждения сульфатом аммония в условиях 85% насыщения. Экзополифосфатазная активность препарата была низкой и не превышала 3 мЕ на 1 мг белка. На рис. 3 показано влияние двухвалентных катионов на эндополифосфатазную активность такого препарата. Ионы Co^{2+} и Zn^{2+} стимулировали активность уже при 0,005 мМ, тогда как ионы Mg^{2+} были слабыми стимуляторами. Co^{2+} оказался более эффективным стимулятором, чем Zn^{2+} . Эта активность проявлялась как с длинноцепочечными полиР₁₈₈, так и с короткоцепочечными полиР₁₅, однако наиболее выраженной она была с полиР₁₈₈ (рис. 4). ADP оказывал стимулирующее воздействие (рис. 5), а АТФ (2 мМ) не влиял на эту активность (не иллюстрируется).

Проведено сравнение содержания фосфата и полиР различных фракций в клетках стационарной стадии роста (рис. 6). Видно, что у штамма-трансформанта увеличилось содержание P и наиболее короткоцепочечных полиР1 и снизилось содержание наиболее длинноцепочечных полиР3 и полиР5. Отметим также, что средняя

длина цепи полиР этих двух фракций у сверхпродуцента уменьшена по сравнению с клетками родительского штамма (рис. 7). В целом, сверхэкспрессия эндополифосфатазы Ppn2 привела к увеличению содержания короткоцепочечных полиР, что согласуется с субстратной специфичностью этого фермента (см. рис. 4).

Рассмотрим, какие еще физиологические особенности проявляются при сверхэкспрессии эндополифосфатазы Ppn2. Известно, что важную роль в устойчивости клеток дрожжей к Cd^{2+} играют кислоторастворимые низкополимерные полиР [21]. Однако, несмотря на увеличение содержания этих полиР у штамма, сверхэкспрессирующего Ppn2, по чувствительности к кадмию разницы между штаммами в диапазоне концентраций 0,01–0,1 мМ не обнаружено. Концентрация 0,05 мМ вызывала ~70% ингибирование роста у обоих штаммов. Штамм CRN/PPN2 оказался более устойчивым к воздействию щелочи и перекиси (рис. 8).

Итак, сверхэкспрессия полифосфатазы Ppn2 в клетках *S. cerevisiae* привела к увеличению эндополифосфатазной активности, зависимой от ионов цинка или кобальта, и наиболее активной в отношении длинноцепочечных полиР. Клетки штамма, сверхпродуцирующего Ppn2, содержат значительно больше фосфата и короткоцепочечных полиР1. Отметим, что штамм, сверхпроду-

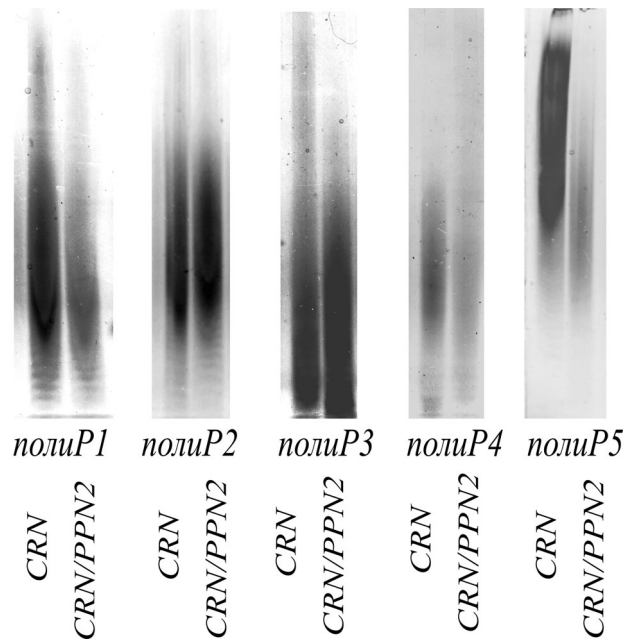


Рис. 7. Электрофорез фракций полиР, экстрагированных из клеток штаммов CRN и CRN/PPN2 *S. cerevisiae*, выращенных на среде YNB до стационарной стадии роста. Представлен результат двух биологических повторностей

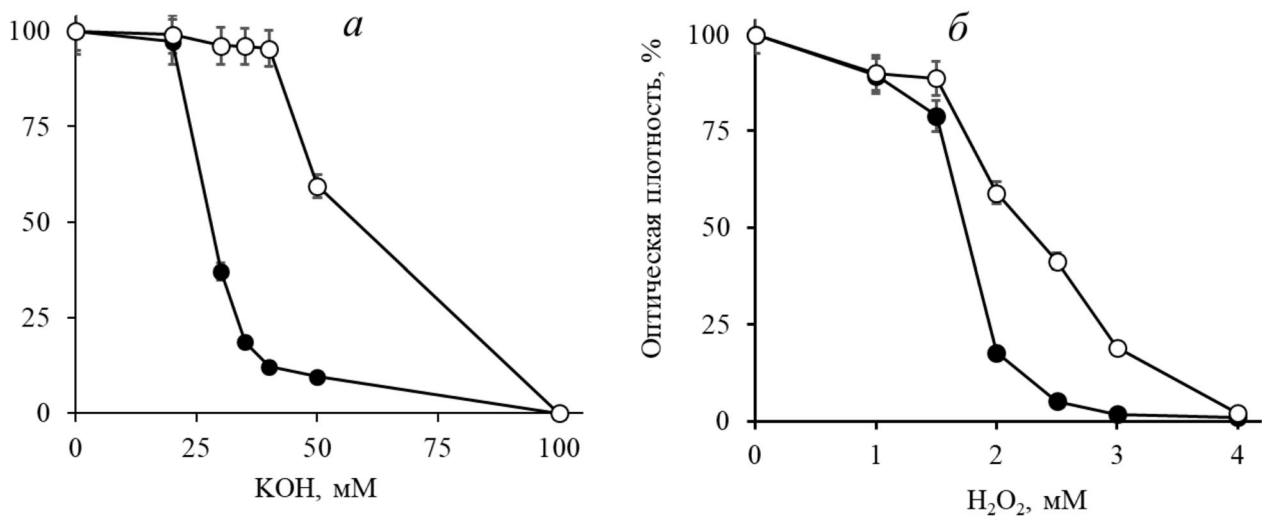


Рис. 8. Подавление роста штаммов CRN (черные кружки) и CRN/PPN2 (белые кружки) при культивировании в присутствии KOH и перекиси. Представлены средние значения трех биологических повторностей

цирующий полифосфатазу Prp1, характеризуется значительным снижением содержания как короткоцепочечных, так и длинноцепочечных полиР [14], а в клетках штаммов, сверхпродуцирующих полифосфатазы Prx1 [13] и Ddp1 [15], не было отмечено значительных изменений в содержании полиР по сравнению с родительским штаммом. Сравнение влияния сверхэкспрессии различных полифосфатаз на содержание полиР у *S. cerevisiae* свидетельствует в пользу представления о разной роли этих ферментов в мине-

ральном фосфорном обмене. Возможно, что увеличение содержания Р и низкополимерных полиР приводит к увеличению внутриклеточного осмотического давления и изменению формы и размера клеток у штамма CRN/PPN2 (рис. 1, б). Подобный эффект у других штаммов, сверхпродуцирующих полифосфатазы, не наблюдали.

Полученные данные позволяют уточнить роль Prp2 в условиях щелочного и окислительного стрессов. Предположено, что короткоцепочечные полиР, которые образуются в увели-

ченном количестве у штамма, сверхпродуцирующего эту полифосфатазу, повышают устойчивость к обоим воздействиям. Известно, что полиР могут выполнять роль «химических» шаперонов, предохраняющих белки от воздействия перекиси [22]. Низкополимерные полиР, обычно гидролизуются полифосфатазой Ppx1 и благодаря этому в клетке появляется больше Р для нейтрализации ионов ОН⁻. Полученный в данной работе штамм CRN/PPN2 представляет интерес

для дальнейшего исследования роли низкомолекулярных полиР в адапционных реакциях клеток *S. cerevisiae*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rao, N. N., Gómez-García, M. R., and Kornberg, A. (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival, *Ann. Rev. Biochem.*, **78**, 605-647, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.083007.093039.
- Clotet, J. (2017) Polyphosphate: popping up from oblivion, *Curr. Genet.*, **63**, 15-18, doi: 10.1007/s00294-016-0611-5.
- Baker, C. J., Smith, S. A., and Morrissey, J. H. (2018) Polyphosphate in thrombosis, hemostasis, and inflammation, *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, **3**, 18-25, doi: 10.1002/rth2.12162.
- Xie, L., and Jakob, U. (2019) Inorganic polyphosphate, a multifunctional polyanionic protein scaffold, *J. Biol. Chem.*, **294**, 2180-2190, doi: 10.1074/jbc.REV118.002808.
- Andreeva, N. A., and Okorokov, L. A. (1993) Purification and characterization of highly active and stable polyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cell envelope, *Yeast*, **9**, 127-139.
- Wurst, H., T. Shiba, T., and Kornberg, A. (1995) The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **177**, 898-906.
- Sethuraman, A., Rao, N. N., and Kornberg, A. (2001) The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8542-8547.
- Andreeva, N., Trilisenko, L., Eldarov, M., and Kulakovskaya, T. (2015) Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces cerevisiae*: switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities, *PLoS One*, **10**, e0119594, doi: 10.1371/journal.pone.0119594.
- Lonetti, A., Szigyarto, Z., Bosch, D., Loss, O., Azevedo, C., and Saiardi, A. (2011) Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases, *J. Biol. Chem.*, **286**, 31966-31974, doi: 10.1074/jbc.M111.266320.
- Gerasimait, R., and Mayer, A. (2017) Ppn2, a novel Zn²⁺-dependent polyphosphatase in the acidocalcisome like yeast vacuole, *J. Cell. Sci.*, **130**, 1625-1636, doi: 10.1242/jcs.201061.
- Andreeva, N., Ledova, L., Ryazanova, L., Tomashevsky, A., Kulakovskaya, T., and Eldarov, M. (2019) Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases, *Biochimie*, **163**, 101-107, doi: 10.1016/j.biochi.2019.06.001.
- Lichko, L. P., Kulakovskaya, T. V., Kulakovskaya, E. V., and Kulaev, I. S. (2008) Inactivation of Ppx1 and PPN1 genes encoding exopolyphosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* does not prevent utilization of polyphosphates as phosphate reserve, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 985-989, doi: 10.1134/S0006297908090046.
- Lichko, L. P., Eldarov, M. A., Dumina, M. V., and Kulakovskaya, T. V. (2014) Ppx1 gene overexpression has no influence on polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1211-1215, doi: 10.1134/S000629791411008X.
- Eldarov, M. A., Baranov, M. V., Dumina, M. V., Shgun, A. A., Andreeva, N. A., Trilisenko, L. V., Kulakovskaya, T. V., Ryazanova, L. P., and Kulaev, I. S. (2013) Polyphosphates and exopolyphosphatase activities in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under overexpression of homologous and heterologous PPN1 genes, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 946-953, doi: 10.1134/S0006297913080129.
- Trilisenko, L. V., Andreeva, N. A., Eldarov, M. A., Dumina, M. V., and Kulakovskaya, T. V. (2015) Polyphosphates and polyphosphatase activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during overexpression of the DDP1 gene, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1312-1317, doi: 10.1134/S0006297915100120.
- Trilisenko, L., Zvonarev, A., Valiakhetmetov, A., Penin, A. A., Eliseeva, I. A., Ostroumov, V., Kulakovskiy, I. V., and Kulakovskaya, T. (2019) The reduced level of inorganic polyphosphate mobilizes antioxidant and manganese-resistance systems in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cells*, **8**, 461, doi: 10.3390/cells8050461.
- Bensadoun, A., and Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials, *Anal. Biochem.*, **70**, 241-250.
- Vagabov, V. M., Trilisenko, L. V., and Kulaev I. S. (2000) Dependence of inorganic polyphosphate chain length on the orthophosphate content in the culture medium of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 349-355.
- Kulakovskaya, T. V., Andreeva, N. A., Karpov, A. V., Sidorov, I. A., and Kulaev, I. S. (1999) Hydrolysis of tripolyphosphate by purified exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* cytosol: kinetic model, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 990-993.
- Andreeva, N., Trilisenko, L., Kulakovskaya, T., Dumina, M., and Eldarov, M. (2015) Purification and properties of recombinant exopolyphosphatase PPN1 and effects of its overexpression on polyphosphate in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 52-56, doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.006.
- Trilisenko, L., Kulakovskaya, E., and Kulakovskaya, T. (2017) The cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* depends on inorganic polyphosphate, *J. Basic Microbiol.*, **57**, 982-986, doi: 10.1002/jobm.201700257.
- Gray, M. J., and Jakob, U. (2015) Oxidative stress protection by polyphosphate-new roles for an old player, *Curr. Opin. Microbiol.*, **24**, 1-6, doi: 10.1016/j.mib.2014.12.004.
- Lichko, L., Kulakovskaya, T., Pestov, N., and Kulaev, I. (2006) Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of Ppx1 and PPN1 genes, *Biosci. Rep.*, **26**, 45-54, doi: 10.1007/s10540-006-9003-2.

**INORGANIC POLYPHOSPHATE AND THE PECULIARITIES
OF PHYSIOLOGY UNDER OVEREXPRESSION
OF *PPN2* GENE IN *Saccharomyces cerevisiae***

**L. P. Ryazanova¹, L. A. Ledova¹, N. A. Andreeva¹,
A. N. Zvonarev¹, M. A. Eldarov², and T. V. Kulakovskaya^{1*}**

¹ *Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences,
Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290 Pushchino,
Moscow Region, Russia; E-mail: alla@ibpm.pushchino.ru*

² *Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia*

Received January 29, 2020

Revised February 15, 2020

Accepted February 17, 2020

The effect of the overproduction of yeast endopolyphosphatase Ppn2 on the metabolism of inorganic polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae* was studied. The expression of the *PPN2* gene in yeast under the control of the strong constitutive promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*PGI*) led to a significant increase in endopolyphosphatase activity, stimulated by cobalt/zinc ions. This activity was higher with long chain polyphosphates, it was stimulated by ADP, and was present in both soluble and membrane subcellular fractions. The content of short-chained polyphosphates in the cells of overexpressing strain increased ~2.5 times as compared with the parent strain. The strain with overexpression of Ppn2 was more resistant to peroxide and alkali. The role of short chained polyphosphates in adaptation to these stress factors is discussed.

Keywords: inorganic polyphosphate, polyphosphatase, *PPN2* gene, overexpression, *Saccharomyces cerevisiae*