

УДК 579.258:579.22

ВЛИЯНИЕ НОКАУТОВ ГЕНОВ ПОЛИФОСФАТАЗЫ *PPN1* И ПОЛИФОСФАТСИНТЕТАЗЫ *VTC4* НА ОСОБЕННОСТИ РОСТА НА ЭТАНОЛЕ И ПОЛИФОСФАТЫ МИТОХОНДРИЙ У *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© 2024 г. А. А. Томашевский^{а, *}, Т. В. Кулаковская^а^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушкино, 142290, Россия

*e-mail: tomashevskialexandr25@gmail.com

Поступила в редакцию 30.08.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 03.10.2023 г.

Одной из функций неорганических полифосфатов (полиР), как соединений с фосфоэфирными связями, является участие в энергетическом обмене. Митохондрии дрожжей содержат собственный пул полифосфатов, однако пути участия этих полимеров в функционировании митохондрий у этих микроорганизмов изучены недостаточно. Целью данной работы было выявление влияния нокаут-мутаций генов полифосфатсинтетазы *VTC4* и одной из полифосфатаз *PPN1* на содержание полифосфатов и полифосфатазную активность в митохондриях *S. cerevisiae* и особенности роста мутантных штаммов на этаноле. Показано, что нокаут гена *VTC4* приводил к значительному снижению содержания полиР в митохондриях. Нокаут гена *PPN1* приводил к исчезновению полифосфатазной активности, но только к небольшому увеличению содержания полифосфатов в митохондриях при росте на глюкозе. При росте на этаноле содержание полиР в митохондриях у данного штамма и родительского штамма совпадало и было примерно в два раза меньше, чем при росте на глюкозе. Оба мутанта способны расти на среде с этанолом в качестве источника углерода, однако характеризуются удлинением лаг-фазы при переходе от потребления глюкозы к потреблению этанола. Сделано предположение, что полифосфаты митохондрий могут представлять собой энергетический резерв этих органелл, необходимый для формирования полноценных митохондрий при переходе от гликолиза к окислительному фосфорилированию.

Ключевые слова: митохондрии, полифосфаты, *PPN1*, *VTC4*, окислительное фосфорилирование, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026365624010045

Неорганические полифосфаты (полиР) – линейные полимеры, содержащие от нескольких до нескольких сотен ортофосфатных остатков и выполняющие в клетке многочисленные функции, включая резервирование фосфата и энергии, связывание катионов, образование мембранных каналов, участие в формировании и функционировании клеточной оболочки, регуляцию экспрессии генов и активности ферментов и приспособление к стрессовым условиям (Kulaev et al., 2004; Rao et al., 2009; Deponcourt, Downey 2021; Orell et al., 2012).

Ген *VTC4* кодирует основной фермент, обладающий полифосфатсинтетазной активностью у дрожжей и синтезирующий полиР с использованием энергии АТФ (Hothorn et al., 2009). *Vtc4* катализирует перенос терминального фосфатного остатка с АТФ на полиР. Активатором полиР синтетазы является 5-PP-InsP5 (Gerasimaite et al., 2017).

Белок *Vtc4* является частью VTC комплекса вакуолярной мембраны дрожжей, в состав которого также входят белки *Vtc1*, *Vtc2* и *Vtc3* (Muller et al., 2002; Muller et al., 2003). Этот комплекс локализован в вакуолярной мембране, и к числу его функций относится функция шаперона по отношению к V-АТФазе этой мембраны и участие в слиянии вакуолярной мембраны с другими мембранными структурами (Muller et al., 2002; Muller et al., 2003). Нокаут-мутанты по гену *VTC4* содержат очень мало полиР по сравнению с родительскими штаммами (Voysse et al., 2006; Tomashevsky et al., 2021).

Ген *PPN1* кодирует фермент, обладающий экзополифосфатазной и эндополифосфатазной активностью и участвующий в регуляции метаболизма полифосфатов (Sethuraman et al., 2001; Andreeva et al., 2015). Моновалентные катионы стимулируют экзополифосфатазную активность *Ppn1*, ионы NH_4^+

также стимулируют и эндополифосфатазную активность (Andreeva et al., 2019). Недавно открыт новый способ пост-трансляционной модификации белков, приводящий к изменению их свойств и активности, — ковалентное присоединение полиР к остаткам лизина, так называемое лизин-полифосфорилирование (Azevedo et al., 2015; 2020). Показано, что Ppn1 способна гидролизовать эти полиР (Azevedo et al., 2015). У мутанта *Δppn1* исчезала полифосфатазная активность митохондриальной мембраны и резко снижалась эта активность в вакуолях и ядрах (Lichko et al., 2006). Эти данные, в совокупности со сравнительным анализом свойств полифосфатаз, свидетельствуют о том, что полифосфатаза Ppn1 локализована в вакуолях, ядрах и митохондриальных мембранах. В первой работе, посвященной идентификации и функциям полифосфатазы Ppn1, было установлено, что мутации в гене *PPN1*, приводящие к отсутствию этой полифосфатазы в клетках *S. cerevisiae*, вызывают увеличение содержания полиР и их длины цепи (Sethuraman et al., 2001). При более детальном анализе содержания различных фракций полиР у мутанта *Δppn1* было показано, что на стационарной стадии роста происходило двукратное увеличение содержания наиболее короткоцепочечной фракции полиР1, а содержание других фракций мало изменялось (Кулаковская и соавт., 2006). Анализ содержания полиР в изолированных субклеточных фракциях показал, что у мутанта *Δppn1* наблюдается увеличение содержания полиР в митохондриях и вакуолях (Lichko et al., 2006). Также было показано, что у штамма *MATa ade2 his3 ura3 ppn1Δ::CgTRP1* (Sethuraman et al., 2001) с нокаутом *PPN1* снижена выживаемость в стационарной стадии роста. Это снижение было объяснено тем, что данный штамм не способен к потреблению лактата и этанола (Pestov et al., 2005). В митохондриях этого штамма снижена полифосфатазная активность и увеличено содержание полиР (Pestov et al., 2005). Было сделано предположение о том, что полиР играют важную роль в регуляции функционального состояния митохондрий дрожжей.

В клетках млекопитающих полиР/поли-β-гидроксипутират- Ca^{2+} комплексы могут участвовать в функционировании канала митохондриальной мембраны, так называемого mitochondrial permeability transition pore (Pavlov et al., 2005). ПолиР митохондрий млекопитающих вовлечены в нормальное функционирование этих органелл и в процесс изменения проницаемости в условиях стресса (Abramov et al., 2007). Недавно было показано, что полиР митохондрий млекопитающих активируют дыхание, не сопряженное с синтезом АТФ (V2), но ингибируют АДФ-зависимое дыхание (V3). Кроме того, они могут стимулировать активность F_0F_1 -АТФазы в присутствии АТФ и могут быть синтезированы и гидролизованы этим ферментом вместо АТФ (Baev et al., 2020).

В недавних работах с культурами человеческих клеток было показано, что значительное ферментативное снижение содержания полиР в митохондриях (посредством экспрессии в генетически модифицированных клетках дрожжевой полифосфатазы PPX) приводит к переключению энергетического обмена клетки с окислительного фосфорилирования на гликолиз (Solesio et al., 2021). В клетках, содержащих такие генетические конструкции, наблюдали изменение экспрессии многих белков митохондрий, что может быть объяснено как общим нарушением метаболизма, так и тем, что полиР митохондрий, возможно, напрямую участвуют в регуляции экспрессии некоторых белков этих органелл (Guitart-Mampel et al., 2022). Эти данные показывают, что полиР митохондрий млекопитающих могут быть одним из важнейших регуляторных факторов этих органелл.

Дрожжи остаются эффективной моделью для исследований в области энергетического обмена у эукариот. В настоящее время доступны коммерческие мутантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, что позволяет проводить исследования с использованием мутантов, содержащих стандартизованные генетические конструкции. Это особенно важно в связи с тем, что многие мутации у дрожжей обладают плейотропным действием, которое может зависеть от способа получения мутантов.

Целью данной работы было выявление влияния нокаут-мутаций по *VTC4* и *PPN1* на полифосфатазную активность и содержание полифосфатов в митохондриях *S. cerevisiae* и особенности роста мутантных штаммов на этаноле с использованием в качестве объекта исследования мутантных штаммов из коллекции Dharmacon.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования. В работе были использованы родительский штамм BY4741 (*MATa his3D1 leu2D0 lys2D0 ura3D0*) и мутантные штаммы *Δppn1* и *Δvtc4*, полученные из коммерческой коллекции Dharmacon.

Состав среды и условия культивирования. Клетки дрожжей выращивали в среде YPD (0.5% дрожжевого экстракта (“Difco”), 1% пептона (“Диаэм”, Россия), 1% глюкозы) в колбах по 200 мл среды на качалке (145 об./мин) при 29°C до стационарной стадии роста, осаждали, промывали и использовали для выделения митохондрий. Для получения митохондрий в условиях культивации на спирте клетки выращивали в среде YPD до стационарной стадии роста, осаждали, промывали водой и переносили в среду YPEth (0.5% дрожжевого экстракта, 1% пептона, 1% этанола) в колбах по 50 мл среды в количестве ~1 г на колбу. Клетки культивировали в течение 10 ч на качалке (250 об./мин) при 29°C. Биомассу осаждали, промывали и использовали

для выделения митохондрий. Для оценки продолжительности лаг-фазы клетки выращивали на среде YPD до логарифмической стадии, осаждали, промывали и переносили в среду YPEth в количестве ~0.3 г сырой биомассы на 50 мл среды.

Выделение митохондрий производили методом дифференциального центрифугирования согласно описанной ранее методике с модификациями (Lichko et al., 2006). Сферопласты, полученные путем инкубации клеток с “улиточным ферментом” (лиофилизированным желудочным соком виноградной улитки), промывали 1.2 М сорбитом и разрушали в буфере (20 мМ Tris-HCl pH 6.8, 1 мМ PMSF (фенилметилсульфонил фторид), 1 мМ ЭДТА, 4 мМ MgSO₄, 0.02% бычий сывороточный альбумин, 0.05% конканавалин А) без осмотического стабилизатора в гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в течение 3 мин. После чего быстро при перемешивании добавляли равный объем того же буфера, но с 1.2 М сорбитом. Гомогенат центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Осадок гомогенизировали тefлоновым пестиком в буфере с 0.6 М сорбитом 1 мин, центрифугировали при 2500 g в течение 10 мин. Митохондрии из супернатанта, полученного после второго низкоскоростного центрифугирования, осаждали при 10000 g в течение 10 мин. Для получения препарата митохондрий из клеток, выращенных на среде с этанолом, клетки, выращенные на среде с глюкозой до стационарной стадии, пересеивали на свежую среду с этанолом и культивировали в течение 10 ч. Разрушение сферопластов проводили в буфере, содержащем 0.6 М сорбит.

Определение белка производили по методу Брэдфорд, используя реагент Coomassie Plus (“Pierce”) согласно протоколу производителя. В качестве стандарта использовали БСА.

Определение ферментативных активностей. АТФазную активность определяли по скорости высвобождения фосфата при 30°C в течение 30 мин в 1 мл реакционной смеси, содержащей 1 мМ MgSO₄ и 1 мМ АТФ в 50 мМ Tris-HCl с pH 8.5 в присутствии и отсутствии 5 мМ NaN₃. Экзополифосфатазную активность определяли по скорости высвобождения фосфата при 30°C в течение 30 мин в 1 мл реакционной смеси, содержащей 2.5 мМ MgSO₄ и 1 мМ полиР со средней длиной цепи 188 фосфатных остатков (концентрация выражена по кислоталабильному фосфору) в 50 мМ Tris-HCl с pH 7.2. Высвобождающийся фосфат в обоих случаях измеряли колориметрически (Kulakovskaya et al., 1999).

Экстракция полиР. Для экстракции полифосфатов к суспензии митохондрий (~1 мг белка) добавляли 1 мл 1 М HClO₄, инкубировали 15 мин при перемешивании при 4°C, осаждали центрифугированием 10000 g 10 мин. В супернатанте измеряли фосфат до и после обработки 1 М HCl при 100°C

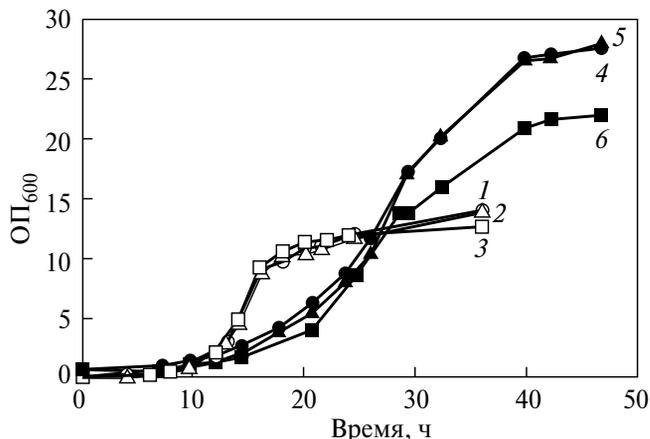


Рис. 1. Кривые роста на среде YPD и YPEth: 1 — родительский штамм на YPD; 2 — штамм с нокаутом гена *PPN1* на YPD; 3 — штамм с нокаутом гена *VTC4* на YPD; 4 — родительский штамм на YPEth; 5 — штамм с нокаутом гена *PPN1* на YPEth; 6 — штамм с нокаутом гена *VTC4* на YPEth.

в течение 10 мин. Уровень кислоторастворимых полифосфатов оценивали по разнице в содержании фосфата до и после указанной обработки. К осадку добавляли 800 мкл 0.5 М HClO₄ и инкубировали при перемешивании 25 мин при 100°C и осаждали при 10000 g 10 мин. Уровень кислотонерастворимых полифосфатов оценивали по количеству выделившегося фосфата.

Эксперименты проводили в трех повторностях, на рисунках представлены средние значения со среднеквадратичным отклонением, рассчитанные с помощью стандартной программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кривые роста штаммов *S. cerevisiae* приведены на рис. 1. В отличие от изученного ранее мутанта с нокаутом гена *PPN1* (*MATa ade2 his3 ura3 ppn1Δ::CgTRP1*) (Sethuraman et al., 2001), штамм, использованный в данной работе, был способен расти на этаноле, и, более того, его рост не отличался от родительского штамма. Мутант с нокаутом гена *VTC4* демонстрировал некоторое замедление роста как на среде с глюкозой, так и на среде с этанолом.

Так как полифосфаты в митохондриях дрожжей хорошо определяются при выращивании на среде с глюкозой, мы выделили митохондрии и измерили в них АТФазную активность, содержание полифосфатов и экзополифосфатазную активность при выращивании клеток на среде YPD. Биомассу собирали в начале стационарной фазы (24 ч). Величина АТФазной активности в Е/мг белка составила 0.531 ± 0.01 у родительского штамма, 0.378 ± 0.01 у штамма с нокаутом гена *PPN1* и 0.520 ± 0.03 у штамма с нокаутом гена *VTC4*. Ингибирование активности азидом

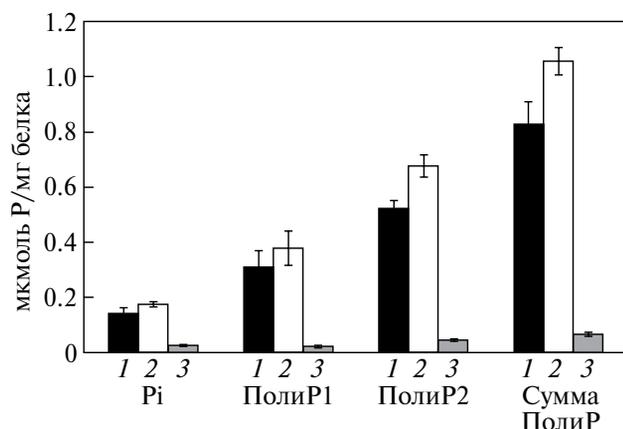


Рис. 2. Содержание полиР в митохондриях из клеток, выращенных на глюкозе, мкмоль Р/мг белка: 1 — родительский штамм; 2 — штамм с нокаутом гена *PPN1*; 3 — штамм с нокаутом гена *VTC4*.

составило 80, 81 и 78% соответственно, что говорит о достаточной чистоте препарата митохондрий.

Данные по содержанию неорганических полифосфатов в митохондриях представлены на рис. 2.

Как видно из рисунка, у штамма с нокаутом гена *VTC4* содержание полифосфатов в митохондриях снижено на порядок, что свидетельствует о том, что большая часть полиР митохондрий синтезируется полифосфатсинтетазой *Vtc4*. Ферментный комплекс, содержащий полифосфатсинтетазу, присутствует не только в вакуолярной мембране, но и в мембране эндоплазматического ретикулума (Gerasimaitė, Mayer, 2016), который имеет тесное взаимодействие с митохондриями, в том числе и посредством везикулярного транспорта (Wozny et al., 2023). По-видимому, основная часть полиР у дрожжей доставляется в митохондрии из эндоплазматического ретикулума. У штамма с нокаутом гена *PPN1* содержание полифосфатов

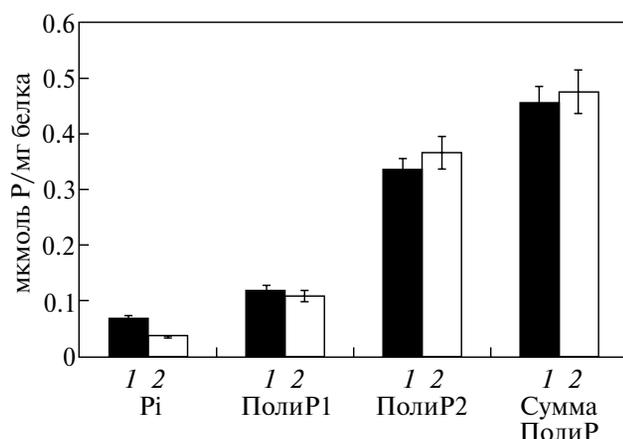


Рис. 3. Содержание полиР в митохондриях из клеток, выращенных на этаноле, мкмоль Р/мг белка: 1 — родительский штамм; 2 — штамм с нокаутом гена *PPN1*.

примерно на 30% больше, чем у родительского. Эта разница существенно менее выражена, чем у пары родительский–мутантный штамм, полученных ранее (Sethuraman et al., 2001) и исследованных в этом отношении (Pestov et al. 2005).

У штамма, изученного ранее, наблюдалось значительное снижение экзополифосфатазной активности. Чтобы проверить, воспроизводится ли этот эффект, была измерена экзополифосфатазная активности в митохондриях у родительского штамма и мутанта с нокаутом гена *PPN1*. Наличие активности удалось достоверно зафиксировать только у штамма дикого типа. Она составила 0.58 ± 0.02 Е/мг белка.

Для объяснения неспособности ранее изученного штамма с нокаутом гена *PPN1* к росту на спирте была предложена гипотеза, согласно которой снижение полифосфатазной активности приводит к неспособности клетки сократить количество полифосфатов в митохондриях при переходе с гликолиза на окислительное фосфорилирование, что, в свою очередь, приводит к нарушению снятия каталитической репрессии. Для проверки этой гипотезы мы выделили митохондрии из клеток родительского штамма и штамма с нокаутом гена *PPN1*, выращенных на спирте, и измерили в них АТФазную активность, содержание полифосфатов и экзополифосфатазную активность. Величина АТФазной активности в Е/мг белка составила 0.513 ± 0.05 у родительского штамма и 0.439 ± 0.03 у штамма с нокаутом гена *PPN1*. Ингибирование активности асидом составило 87 и 85% соответственно.

Экзополифосфатазная активность составила 0.055 ± 0.001 и 0.019 ± 0.001 Е/мг белка у родительского и мутантного штамма соответственно. Как видно, в данных условиях у обоих штаммов активность очень низкая. При этом у мутантного штамма она в 3 раза меньше, чем у родительского. Однако содержание полифосфатов (рис. 3) у штаммов одинаковое и снижено в сравнении с данными при росте на глюкозе.

Известно, что при росте на этаноле или лактате уровень полиР в митохондриях низкий (Pestov et al., 2004). Мы предполагали, что это снижение связано с гидролизом полифосфатов полифосфатазой *Ppn1*, которая присутствует в митохондриальной мембране (Lichko et al., 2006). Однако в данной серии мутантов отсутствие полифосфатазы *Ppn1* не оказало существенного влияния на содержание полиР в митохондриях как при росте на глюкозе, так и при росте на этаноле. Вероятно, снижение содержания полиР при росте на этаноле обеспечивается либо снижением поступления их в эти органеллы, либо участием других белков в их гидролизе. Причины того, что мутант по данному гену, который был исследован ранее (Pestov et al., 2005), имел повышенное содержание полиР в митохондриях и не потреблял окисляемые субстраты, остаются неизвестными и, по-видимому, связаны с особенностями

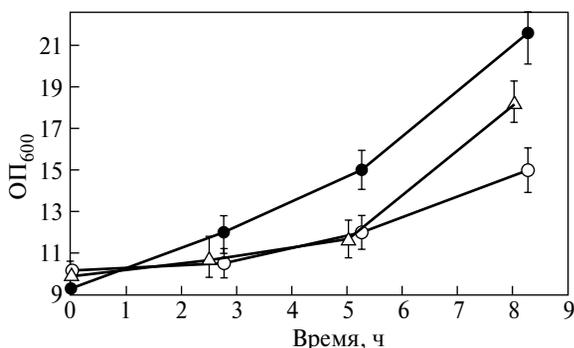


Рис. 4. Возобновление роста штаммов после пересева на среду *YPEth*: 1 — родительский штамм; 2 — штамм с нокаутом гена *PPN1*; 3 — штамм с нокаутом гена *VTC4*.

генетического конструирования мутанта, которое могло затронуть и другие гены.

Хотя кривые роста мутантных штаммов при обычном способе посева отличались незначительно (рис. 1), мы использовали условия культивирования, когда засев производится существенным количеством биомассы, что позволяет более четко наблюдать лаг-фазу роста (см. раздел Материалы и методы исследования) (рис. 4).

Как видно из рис. 4, при переходе клеток от потребления глюкозы к потреблению этанола, и, соответственно, с гликолиза на окислительное фосфорилирование, у мутанта с нарушенным синтезом полиР наблюдается значительная задержка возобновления роста по сравнению с родительским штаммом. Данное наблюдение позволяет предположить, что полиР митохондрий являются значимым фактором при переключении метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование. Поэтому их нехватка, вызванная нарушением их синтеза, приводит к увеличению длительности лаг-фазы. Однако у мутанта с нокаутом гена *PPN1* задержка возобновления роста тоже наблюдается, хоть и не столь значительная. Известно, что *Ppn1* регулирует не только количество полифосфатов, но и их длину цепи (Andreeva et al., 2015). Можно предположить, что для перехода на окислительное фосфорилирование важны полифосфаты митохондрий определенной, низкой длины цепи, образующиеся благодаря эндополифосфатазной активности *Ppn1*.

Можно заключить, что полифосфатсинтетаза *Vtc4* ответственна за синтез основной части полиР митохондрий дрожжей. *Ppn1* ответственна за всю измеряемую экзополифосфатазную активность митохондрий, однако, ее отсутствие не оказало существенного влияния на обмен полифосфатов в этих органеллах. Полученные данные не противоречат гипотезе об участии полиР митохондрий в переключении метаболизма между гликолизом и окислительным фосфорилированием.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кулаковская Т. В., Трилисенко Л. В., Личко Л. П., Вагабов В. М., Кулаев И. С. Влияние инактивации генов экзополифосфатазы *PPX1* и *PPN1* на содержание полифосфатов различных фракций у *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 35–39.
- Kulakovskaya T. V., Trilisenko L. V., Lichko L. P., Vagabov V. M., Kulaev I. S. The effect of inactivation of the exo- and endopolyphosphatase genes *PPX1* and *PPN1* on the level of different polyphosphates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 25–28.
- Abramov A., Fraley C., Diao C., Winkfein R., Colicos M., Duchon M., French R., Pavlov E. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 18091–18096.
- Andreeva N., Trilisenko L., Eldarov M., Kulakovskaya T. Polyphosphatase *PPN1* of *Saccharomyces cerevisiae*: switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0119594.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119594>
- Andreeva N., Ledova L., Ryazanova L., Tomashevsky A., Kulakovskaya T., Eldarov M. Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with *Ppn1*, *Ppx1*, and *Ddp1* polyphosphatases // Biochimie. 2019. V. 163. P. 101–107.
- Azevedo C., Livermore T., Saiardi A. Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate // Molecular Cell. 2015. V. 58. P. 71–82.
- Azevedo C., Desfougères Y., Jiramongkol Y., Partington H., Trakansuebkul S., Singh J., Steck N., Jessen H. J., Saiardi A. Development of a yeast model to study the contribution of vacuolar polyphosphate metabolism to lysine polyphosphorylation // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 1439–1451.
- Baev A. Y., Angelova P. R., Abramov A. Y. Inorganic polyphosphate is produced and hydrolyzed in F_0F_1 -ATP synthase of mammalian mitochondria // Biochem. J. 2020. V. 477. P. 1515–1524.
- Boyce K. J., Kretschmer M., Kronstad J. W. The *vtc4* gene influences polyphosphate storage, morphogenesis, and virulence in the maize pathogen *Ustilago maydis* // Eucar. Cell. 2006. V. 5. P. 1399–1409.

- Denoncourt A., Downey M. Model systems for studying polyphosphate biology: a focus on microorganisms // *Curr. Genet.* 2021. V. 67. P. 331–346.
- Gerasimaitė R., Mayer A. Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles // *Biochem. Soc. Trans.* 2016. V. 44. P. 234–239.
- Gerasimaitė R., Pavlovic I., Capolicchio S., Hofer, A., Schmidt A., Jessen H. J., Mayer A. Inositol pyrophosphate specificity of the SPX-dependent polyphosphate polymerase VTC // *ACS Chem. Biol.* 2017. V. 12. P. 648–653.
- Guitart-Mampel M., Urquiza P., Carnevale Neto F., Anderson J. R., Hambarikar V., Scoma E. R., Merrihew G. E., Wang L., MacCoss M.J., Raftery D., Peffers M. J., Soleisio M. E. Mitochondrial inorganic polyphosphate (polyP) is a potent regulator of mammalian bioenergetics in SH-SY5Y cells: a proteomics and metabolomics study // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. P. 833127. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.833127>
- Hothorn M., Neumann H., Lenherr E. D., Wehner M., Rybin V., Hassa P. O., Uttenweiler A., Reinhardt M., Schmidt A., Seiler J., Ladurner A. G., Herrmann C., Scheffzek K., Mayer A. Catalytic core of a membrane-associated eucaryotic polyphosphate polymerase // *Science.* 2009. V. 324. P. 513–516.
- Kulaev I. S., Vagabov V. M., Kulakovskaya T. V. The biochemistry of inorganic polyphosphates. Chichester: Wiley, 2004.
- Kulakovskaya T. V., Andreeva N. A., Karpov A. V., Sidorov I. A. Kulaev I. S. Hydrolysis of tripolyphosphate by purified exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cytosol: kinetic model // *Biochemistry (Moscow).* 1999. V. 64. P. 1180–1184.
- Lichko L., Kulakovskaya T., Pestov N., Kulaev I. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of *PPX1* and *PPN1* genes // *Biosci. Rep.* 2006. V. 26. P. 45–54.
- Muller O., Bayer M. J., Peters C., Andersen J. S., Mann M., Mayer A. The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V(0) trans-complex formation // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 259–269.
- Muller O., Neumann H., Bayer M. J., Mayer A. Role of Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 1107–1115.
- Orell A., Navarro C. A., Rivero M., Aguilar J. S., Jerez C. A. Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions // *Extremophiles.* 2012. V. 16. P. 573–583.
- Pavlov E., Zakharian E., Bladen C., Diao C. T., Grimbley C., Reusch R. N., French R. J. A large, voltage-dependent channel, isolated from mitochondria by water-free chloroform extraction // *Biophys J.* 2005. V. 88. P. 2614–2625.
- Pestov N. A., Kulakovskaya T. V., Kulaev I. S. Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess // *FEMS Yeast Res.* 2004. V. 4. P. 643–648.
- Pestov N. A., Kulakovskaya T. V., Kulaev I. S. Effects of inactivation of the *PPN1* gene on exopolyphosphatases, inorganic polyphosphates and function of mitochondria in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2005. V. 5. P. 823–828.
- Rao N. N., Gómez-García M.R., Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival // *Ann. Rev. Biochem.* 2009. V. 78. P. 605–647.
- Sethuraman A., Rao N. N., Kornberg A. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 8542–8547.
- Solesio M. E., Xie L., McIntyre B., Ellenberger M., Mitaishvili E., Bhadra-Lobo S., Bettcher L. F., Bazil J. N., Raftery D., Jakob U. Depletion of mitochondrial inorganic polyphosphate (polyP) in mammalian cells causes metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis // *Biochem. J.* 2021. V. 478. P. 1631–1646.
- Tomashevsky A., Kulakovskaya E., Trilisenkob L., Kulakovskiy I., Kulakovskaya T., Fedorov A., Eldarov M. VTC4 polyphosphate polymerase knockout increases stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* // *Cells. Biol.* 2021. V. 10. Art. 487. <https://doi.org/10.3390/biology10060487>
- Wozny M. R., Di Luca A., Morado D. R., Picco A., Khaddaj R., Campomanes P., Ivanović L., Hoffmann P. C., Miller E. A., Vanni S., Kukulski W. In situ architecture of the ER-mitochondria encounter structure // *Nature.* 2023. V. 618. P. 188–192. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06050-3>

The Influence of Knockouts of *PPN1* Polyphosphatase and *VTC4* Polyphosphate Synthetase Genes on Growth on Ethanol and Mitochondrial Polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae*

A. A. Tomashevski^{1, *}, T. V. Kulakovskaya¹

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

*e-mail: tomashevskialexandr25@gmail.com

Received August 30, 2023; revised October 3, 2023; accepted October 3, 2023

Abstract—One of the functions of inorganic polyphosphates (polyP), as compounds with phosphoester bonds, is participation in energy metabolism. Yeast mitochondria contain their own pool of polyphosphates; however, the ways in which these polymers are involved in the functioning of mitochondria in these microorganisms are not well understood. The aim of this work was to identify the effect of knockout mutations of the *VTC4* polyphosphate synthetase gene and *PPN1* one of the polyphosphatases gene on the content of polyphosphates and polyphosphatase activity in mitochondria of *S. cerevisiae* and the characteristics of the growth of mutant strains on ethanol. It was shown that knockout of the *VTC4* gene led to a significant decrease in the content of polyP in mitochondria. Knockout of the *PPN1* gene led to the disappearance of polyphosphatase activity, but only to a slight increase in the content of polyphosphates in mitochondria during growth on glucose. When grown on ethanol, the polyP content in the mitochondria of this strain coincided with that of the parental strain, and in both strains it was approximately two times less than when grown on glucose. Both mutants are able to grow on a medium with ethanol as a carbon source; however, they are characterized by an elongation of the lag phase upon the transition from glucose consumption to ethanol consumption. It has been suggested that mitochondrial polyphosphates may represent the energy reserve of these organelles, which is necessary for the formation of full-fledged mitochondria during the transition from glycolysis to oxidative phosphorylation.

Keywords: mitochondria, polyphosphates, *PPN1*, *VTC4*, oxidative phosphorylation, *Saccharomyces cerevisiae*