

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ Pho3p И Bgl2p, НА УРОВЕНЬ ПОЛИФОСФАТОВ, АДАПТАЦИЮ К СТРЕССУ И ЗАКРЕПЛЕНИЕ ЭТИХ БЕЛКОВ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2023 Т.С. Калебина^{1*}, Е.В. Кулаковская², В.В. Рекстина¹, Л.В. Трилисенко²,
Р.Х. Зиганшин³, Н.В. Мармий⁴, Д.С. Есипов⁵, Т.В. Кулаковская²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра молекулярной биологии,
119234 Москва, Россия; электронная почта: kalebina@gmail.com

² ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 142290 Пушкино, Россия

³ Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

⁴ «НИИ Митохондриологии МГУ», 119992 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биоорганической химии, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.07.2022

После доработки 07.11.2022

Принята к публикации 20.12.2022

Неорганические полифосфаты (полиР), согласно косвенным литературным данным, участвуют в регуляторных процессах в молекулярном комплексе клеточной стенки (КС) дрожжей. Целью работы было выявление взаимосвязи между полиР, кислой фосфатазой Pho3p и мажорным белком КС, глюканозилтрансглюкозилазой Bgl2p — основным глюканре моделирующим ферментом с амилоидными свойствами. Установлено, что клетки мутантного штамма с делецией гена *PHO3* содержат больше высокополимерных щелочерастворимых полиР, а также более устойчивы к щелочи и ионам марганца по сравнению со штаммом дикого типа. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что Pho3p ответственна за гидролиз высокополимерных полиР на поверхности клеток дрожжей, а эти полиР являются одним из факторов устойчивости к стрессам. Штамм с делецией гена *BGL2* схож со штаммом *Δpho3* по содержанию высокомолекулярных щелочерастворимых полиР и устойчивости к щелочи и марганцу. Сравнительный анализ белков КС продемонстрировал корреляцию между экстрагируемостью кислой фосфатазы и Bgl2p, а также выявил изменение способа закрепления Bgl2p в КС штамма, лишённого Pho3p. Предположено, что Bgl2p и Pho3p способны образовывать метаболон или его части, который объединяет биогенез основного структурного полимера КС — глюкана и катаболизм важнейшего регуляторного полимера — полифосфатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дрожжи, клеточная стенка, полифосфаты, кислая фосфатаза, глюканозилтрансглюкозилаза, Pho3p, Bgl2p, стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523010098, EDN: PCQVXC

ВВЕДЕНИЕ

Клеточная стенка (КС) дрожжей является зоной непосредственного контакта клеток дрожжей с окружающей средой и играет важную роль в адаптации этих микроорганизмов к различным источникам углерода, в развитии и старении, в реакции на стресс [1–4], в регуля-

ции морфогенеза [5] и адгезии [6]. Структурной основой КС является мегаглюкоконъюгат (мГК), покрывающий клетку дрожжей. Более чем наполовину мГК состоит из мало-разветвленных молекул высокополимерного β-1,3-глюкана и разветвленного β-1,6-глюкана, на молекулах которых закреплены функционально важные белки. За формирование

Принятые сокращения: КС — клеточная стенка; полиР — неорганические высокомолекулярные полифосфаты.

* Адресат для корреспонденции.

глюкановой сети и её постоянную перестройку в процессе роста и деления клеток ответственны белки КС, в частности — те из них, которые закреплены без формирования ковалентной связи с глюканом, среди которых можно выделить мажорный глюканре моделирующий фермент — глюканозилтрансгликозилазу Bgl2p [7–9], и кислую фосфатазу Pho3p [10, 11]. Основными молекулами, входящими в состав мГК и образующими КС дрожжей, являются полисахариды и белки, однако важным компонентом КС являются также и высокомолекулярные полиР [12–16]. Существует корреляция между накоплением фракции полиР4 и полисахаридов КС у *Saccharomyces cerevisiae* [17–20].

Функции полиР КС связаны со способностью этих отрицательно заряженных полимеров взаимодействовать с полисахаридами и белками данного клеточного компартмента. ПолиР играют важную роль в структурной организации КС [21]. ПолиР отвечают за поддержание отрицательного заряда на клеточной поверхности грибов [15, 16]. Предложена гипотетическая схема регуляции активности Bgl2p с участием полиР [11].

Суммируя, функции полиР в клеточной оболочке можно охарактеризовать как регуляторные и защитные, поскольку эти полимеры участвуют в регуляции активности ферментов, а также в поддержании отрицательного заряда на поверхности и нейтрализации токсичных для клеток веществ путём образования с ними комплексов.

Кислые фосфатазы у *S. cerevisiae* участвуют в системе гомеостаза фосфатов [22–25]. Два соседних гена *YBR092C* и *YBR093C* кодируют конститутивный фермент Pho3p и репрессируемый фермент Pho5p соответственно (<https://www.yeastgenome.org>). Оба фермента локализованы в клеточной оболочке [22, 26, 27]. Pho5p синтезируется при фосфатном голодании и обладает активностью нуклеозид-трифосфатазы и нуклеозид-трифосфатпирофосфатазы [22, 28]. Очищенная Pho5p показала одинаковую активность с *p*-нитрофенилфосфатом, АТР, АДФ, глицерофосфатом и глюкозо-6-фосфатом, в то время как к гидролизу полиР она способна не была [29]. Известно, что Pho3p гидролизует тиаминфосфаты в периплазматическом пространстве, увеличивая поглощение тиамина [26, 27]. Данные об активности Pho3p с полиР отсутствуют.

Bgl2p, один из основных глюканре моделирующих белков КС дрожжей со свойствами амилоида, устойчив к обработке детергентами и протеиназами, после выделения из КС способен образовывать фибриллы [7, 8]. Условия формирования этим белком фибрилл на кле-

точной поверхности дрожжей практически не изучены. На основании предварительных экспериментов [30] и данных, полученных при изучении влияния делеции гена кислой фосфатазы Pho3p на активность Bgl2p [11], нами было предположено, что оба фермента, входящих в состав пула белков, экстрагируемых из КС с помощью Tris [31], могут функционировать во взаимной корреляции, возможно, как метаболон или его часть, оказывая взаимное влияние на закрепление и функциональную активность. В настоящее время такие данные в литературе практически не представлены, в то же время они имеют очень большое значение для понимания регуляции биогенеза КС дрожжей. Важную роль в процессе их взаимодействия могут играть регуляторные молекулы — полифосфаты. Данная работа посвящена проверке высказанного предположения и продолжению исследований структурной и функциональной взаимосвязи двух ключевых ферментов КС дрожжей, обеспечивающих биогенез важнейших полимеров, входящих в состав этой органеллы: регуляторного — полифосфатов и структурного — глюкана.

Целью настоящего исследования явился анализ содержания полиР и адаптивных особенностей дрожжей с делецией генов *PHO3* и *BGL2*, кодирующих кислую фосфатазу и глюканозилтрансгликозилазу КС *S. cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы дрожжей и условия их выращивания. Дрожжи *S. cerevisiae* BY4742 Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0* («Invitrogen», США), далее «родительский штамм» или «WT», и его производные: «*Abgl2*» Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 bgl2::URA3* и «*Δpho3*» Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 pho3::LEU2*, а также соответствующие контрольные штаммы со вставкой генов аналогичных ауксотрофностей: «WT+URA3» Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0::URA3* и «WT+LEU2» Mat α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0::LEU2* — были получены как описано ниже в данной работе. Указанные штаммы поддерживали на твёрдых средах YNB и YPD [32] и для получения экспериментальных результатов выращивали на жидкой среде YPD при 28 °C и аэрации 200 об./мин до поздней логарифмической стадии.

Конструкция штаммов. Штаммы *S. cerevisiae* *Abgl2*, *Δpho3*, WT+URA3 и WT+LEU2 были получены на основе штамма BY4742 в результате гомологичной рекомбинации после трансформации с помощью ацетата лития, одноцепочечной ДНК и полиэтиленгликоля [33, 34].

Последовательность нуклеотидов праймеров, использованных в данной работе

№	Последовательность нуклеотидов
1	5'-GTTTTTTTTCAATATAAGTTTATTGAGATAGACAACCTAACCA AAAAGAAAAACGGTCAAAGAGCTTTTCAATTCATCTTTTTT-3'
2	5'-TATTCCTCACCTAAACAGAAAGGAAAAAGCCATTCTTGTTTAA AGAGTATTTTTAAAGCGTCGGGTAATAACTGATATAATTAAAT-3'
3	5'-TTTTCACTTCAAGTGACAATTTGAAATACTCCTTGGACT GTGACTTTTCATGAGCTTTTCAATTCATCTTTTTTTTTT-3'
4	5'-TTTGCTGGATGGAAGTCAATTATGCCTTGATTATCATAAAAAATACTA CAGTAAAGAAAGGGCCATTCCAAATTACCTAAATTCGATGACTGGAAATT-3'
5	5'-AAAGAAGATCAGAATCGATGGGTATTTATTTATATTTGC AATATTATTTATTTATACAATTTAAGCAAGGATTTTCTTAA-3'
6	5'-ATACTACTCACTACAACGATACCCTATTTAAACAATA AATTGTATAAATAAATAAAAAATTCGATGACTGGAAATT-3'

Ауксотрофный маркер *URA3* был амплифицирован с использованием пар праймеров «1 и 2» и «2 и 3» с плазмиды pJJ244 для получения штаммов *Δbgl2* и WT+*URA3* соответственно (таблица). Ауксотрофный маркер *LEU2* был амплифицирован с использованием пар праймеров «4 и 5» и «5 и 6» с плазмиды pJJ282 для получения штаммов *Δpho3* и WT+*LEU2* соответственно (таблица). Трансформанты были отобраны на твёрдых селективных средах YNB без урацила для штаммов *Δbgl2* и WT+*URA3* и без лейцина для штаммов *Δpho3* и WT+*LEU2* соответственно [32].

Экстракция полифосфатов. Клетки дрожжей, выращенные как описано выше, собирали центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин, дважды промывали дистиллированной водой и замораживали при -20°C . Из полученной биомассы последовательной обработкой растворами кислот, солей и щелочей выделяли 4 фракции полифосфатов согласно ранее описанному методу [35]: кислоторастворимую (полиР1), солерастворимую (полиР2), две щёлочерастворимые (полиР3 и полиР4). Кислоторастворимую фракцию (полиР1) получали обработкой пробы хлорной кислотой в течение 15 мин при 0°C и постоянном перемешивании (на 1 г пробы добавляли 1 мл 1 М HClO_4 и 9 мл 0,5 М HClO_4). После экстракции суспензию центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Экстракцию повторяли дважды и полученные супернатанты объединяли. Для удаления нуклеотидов, которые содержатся в данной фракции, к супернатанту добавляли 0,1 г активированного угля Норит («Sigma-Aldrich») на 1 мл экстракта и инкубировали на холоде в течение 30 мин.

Для выделения солерастворимой фракции (полиР2) к осадку, полученному после экстрак-

ции кислоторастворимой фракции, добавляли 2 г NaClO_4 и 0,5 мл 1 М HClO_4 (из расчёта на 1 г пробы) и инкубировали на холоде при перемешивании в течение 15 мин, затем добавляли 10 мл холодной дистиллированной воды и снова выдерживали на холоде в течение 15 мин при перемешивании. Полученную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 5000 g. Экстракцию повторяли дважды и полученные супернатанты объединяли.

Затем получали фракцию полиР3 (растворимую в слабой щёлочи) экстракцией раствором NaOH , имеющим pH 9–10, при 0°C дважды по 15 мин при перемешивании. Полученную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 5000 g. Экстракцию повторяли дважды и полученные супернатанты объединяли.

Щёлочерастворимую фракцию (полиР4) экстрагировали 0,05 М NaOH при 0°C 2 раза по 15 мин, центрифугировали в течение 20 мин при 5000 g и полученные супернатанты объединяли.

Количество полиР в полученных экстрактах определяли по содержанию образовавшегося при гидролизе ортофосфата (P_i), как описано ранее [29].

Получаемые фракции различаются по среднему количеству фосфатных остатков: полиР1 – 15, полиР2 – 25, полиР3 – 60–70, полиР4 – свыше 100 фосфатных остатков [36].

Анализ чувствительности дрожжей к стрессовым факторам. Влияние $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и KOH на рост дрожжей определяли путём посева образцов клеток (стандартизированных по плотности культуры) в стерильный 96-луночный иммунопланшет с крышкой, ячейки которого содержали среду YPD и аликвоты стерильных растворов $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или KOH .

Через 24 ч культивирования плотность культур измеряли на планшетном фотометре (МЗ «Сапфир», Россия) при длине волны 595 нм. Влияние марганца на рост определяли после 96 ч культивирования штаммов в жидкой среде YPD с добавлением 1,75 мМ $MnSO_4$ путём подсчёта клеток в камере Горяева.

Выделение и частичная депротеинизация КС. Клетки дрожжей, выращенные до поздней логарифмической фазы, разрушали и полученные КС депротеинизировали с использованием 1% SDS (*m/V*), как описано ранее [31]. Оптическую плотность КС в суспензии определяли с помощью спектрофотометра Cary Eclipse («Varian Inc.», США) при длине волны 540 нм.

Получение белковых экстрактов из КС. Экстракты из КС в 0,1 М Tris («Amresco», США), pH 9,8, и в 6 М гуанидингидрохлориде («Appli-Chem», Германия), pH 5,6, получали, как описано ранее [31] с модификациями.

Электрофорез белков и вестерн-блот анализ. Экстракты из КС анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в ПААГ [37]. Белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham Protran (0,45 мкм, «Sigma-Aldrich», США). Bgl2p выявляли с использованием антител [31] с помощью системы ECL («Thermo Fisher Scientific», США) [38].

Подготовка проб для LC-MS/MS-анализа. К экстрактам из КС добавляли 0,1 М Tris-HCl, pH 8,5, с 1%-ным дезоксихолатом (*m/V*) и 10 мМ дитиотреитолом до конечной концентрации. Затем кипятили в течение 10 мин и остужали при комнатной температуре. Экстракты хранили при 4 °С. Дальнейшая подготовка проб, жидкостная хроматография и масс-спектрометрический анализ были проведены, как описано ранее [39].

Метод определения 8-оксо-гуанозина. Клетки дрожжей, выращенные до поздней логарифмической фазы, собирали центрифугированием в течение 5 мин при 1650 g, дважды промывали буфером TE (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0), после чего проводили выделение нуклеиновых кислот, как описано ранее [40], с некоторыми модификациями. Полученные осадки нуклеиновых кислот перерастворяли в 200 мкл дистиллированной воды, добавляли 20 мкл 10-кратного 300 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 4,6, с 2,8 М NaCl и 10 мМ $ZnSO_4$ и инкубировали с нуклеазой S1 («Sigma-Aldrich», 2 ед. акт.) в течение 2 ч при 37 °С для гидролиза РНК. К инкубационной смеси добавляли 50 мкл 5-кратного буфера: 200 мМ Tris-HCl, 200 мМ NaCl, 40 мМ $MgCl_2$, pH 9,5, и щелочную фосфатазу («Thermo Fisher Scientific»,

2 ед. акт.), инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Полученные гидролизаты РНК прогревали в течение 2 мин при 90 °С с последующим отделением супернатанта для хроматографического анализа путём центрифугирования при 12 000 g.

ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Полученные образцы анализировали с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ (колонок Phenomenex Luna C18(2), 250*4,6 мм) с использованием спектрофотометрической (260 нм) и амперометрической (0,4 В) детекции. Раствор А: 0,1 М ацетат аммония. Раствор Б: ацетонитрил. Изократическое элюирование. 4%-ный раствор ацетонитрила (*v/v*) в 0,1 М ацетате аммония. Скорость потока 1 мл/мин.

Статистическая обработка данных. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

К началу нашей работы в литературе отсутствовали убедительные данные, свидетельствующие в пользу того, что, с одной стороны, кислая фосфатаза Pho3p способна гидролизовать высокополимерные полифосфаты, а с другой стороны, что эти полимеры локализованы на поверхности клетки дрожжей, т.е. именно там, где, по многочисленным данным, локализован этот фермент. Для верификации этих положений нами был получен штамм с делетированным геном *PHO3* и проведён сравнительный анализ содержания различных фракций полифосфатов в данном и в родительском штаммах дрожжей (рис. 1), который показал, что содержание фосфата (Pi) и трёх фракций полиР, различающихся длиной цепи (полиР1–3), в клетках обоих штаммов практически не изменилось, в то время как содержание высокополимерных щёлочерастворимых полиР4 увеличилось у штамма, лишённого кислой фосфатазы, почти в два раза. Исследователи давно указывали на то, что полиР4 с высокой степенью вероятности могут быть отнесены к полимерам, локализованным в КС [41]. Возрастание содержания этой фракции полифосфатов в штамме с отсутствием фермента, осуществляющего их гидролиз, убедительно свидетельствует в пользу правильности предположения И.С. Кулаева о локализации полиР4 в КС.

Отметим, что фракция полиР4 характеризуется несколькими особенностями по сравнению с другими фракциями полиР: это высокомолекулярные полиР со средней длиной цепи

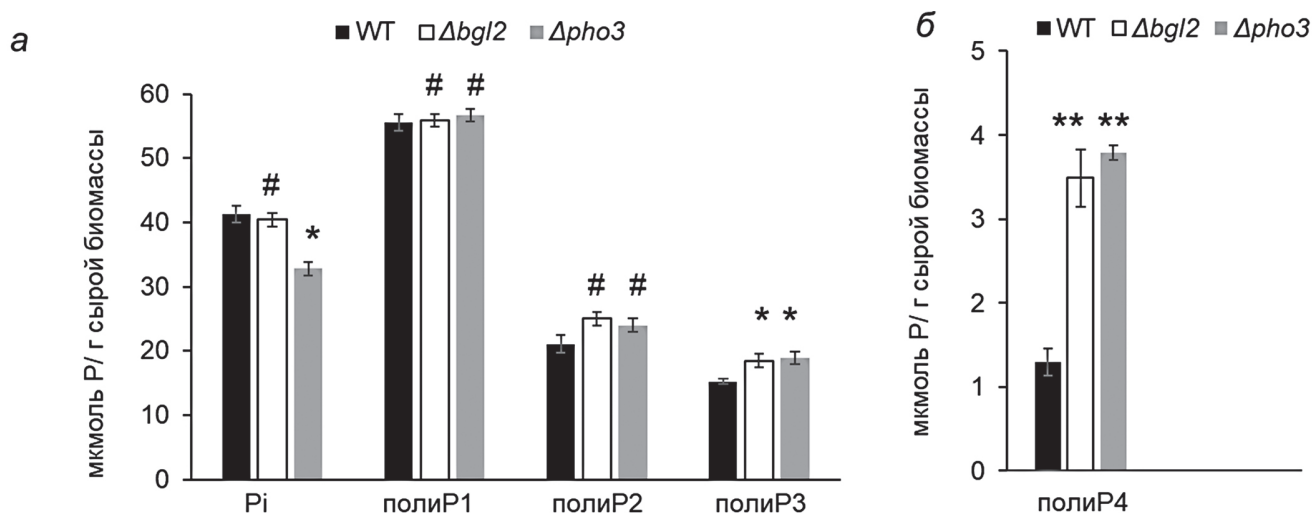


Рис. 1. Содержание различных фракций неорганических полифосфатов в клетках дрожжей *S. cerevisiae* родительского штамма WT и штаммов $\Delta bgl2$ и $\Delta pho3$. *а* – Содержание Pi, полифосфатов фракций полиP1, полиP2 и полиP3 (см. материалы и методы). *б* – Содержание фракции полиP4, согласно литературным данным, ассоциированной с КС. Представлены средние значения из трёх опытов. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, # разница статистически незначима

около 100 фосфатных остатков, эти полиР не проявляют, в отличие от других фракций, эффекта гиперкомпенсации, т.е. многократного возрастания после фосфорного голодания, эта фракция также в наименьшей степени тратится при фосфорном голодании по сравнению с другими фракциями [36]. Гипотеза о том, что полиР4 локализованы в КС, связана с тем, что есть корреляция между накоплением фракции полиР4 и полисахаридов КС у *S. cerevisiae* [17–20], а также между уровнем этой фракции и отрицательным зарядом на клеточной поверхности дрожжей [15, 16]. К сожалению, современные методы получения чистых препаратов КС дрожжей приводят к разрушению и вымыванию из препаратов содержащихся в стенке полифосфатов. Поэтому пока не удалось напрямую определить содержание и длину цепи полиР в препаратах КС. Наличие полиР в стенках хорошо фиксируется у многих видов дрожжей посредством специальной окраски DAPI, который, в отличие от ДНК, даёт с полиР оранжевую или зелёную окраску [21, 42, 43].

Итак, как и ожидалось, отсутствие Pho3p привело к увеличению содержания фракции полиР4, что свидетельствует в пользу участия этого фермента в контроле содержания полиР в КС.

Интересно отметить, что увеличение количества полифосфатов полиР4 наблюдается не только в случае штамма с делецией гена кислой фосфатазы, но и у штамма с делецией гена глюканозилтрансглюкозилазы Bgl2 (рис. 1) при сохранении уровня анализируемых соединений в контрольных штаммах WT, WT+URA3 и WT+LEU2, что свидетельствует о возможном

взаимодействии и взаимовлиянии этих ферментов друг на друга, иными словами, позволяет предположить, что они образуют метаболон или его часть. Данные экспериментов по определению содержания этих ферментов в КС дрожжей отчасти подтверждают сказанное.

Как уже указывалось ранее, Bgl2p и Pho3p являются белками КС дрожжей. В наших экспериментах оба белка были достоверно определены в изолированных КС родительского штамма дрожжей методом LC-MS/MS-анализа во фракции белков, не закреплённых ковалентно на полисахаридах КС, экстрагируемых 0,1 М Tris в щелочных условиях. В штамме с делецией гена, кодирующего Bgl2p, этот белок отсутствует, равно как и Pho3p отсутствует в штамме с делетированным геном PHO3.

Следует отметить, что число пептидов, определяемых в экстрагируемых белках LC-MS/MS-анализом, в различных экспериментах несколько отличается, даже если при экстракции использованы одинаковые количества КС. При этом анализ числа пептидов экстрагируемых ферментов Bgl2p и Pho3p из КС родительского штамма, проведённый в серии экспериментов, свидетельствует о наличии пропорциональной зависимости экстрагируемости кислой фосфатазы от количества экстрагируемого Bgl2p (рис. 2). Другие белки, например, глюканремоделирующие ферменты КС, не демонстрируют такой закономерности (данные не приведены).

Следует отметить, что нами обнаружена и обратная ситуация: мы наблюдали влияние отсутствия кислой фосфатазы и, как следствие, увеличения количества полифосфатов в КС этих

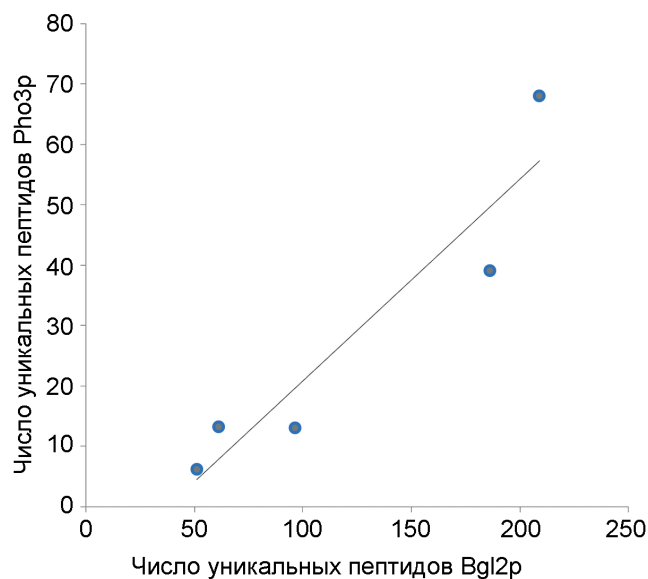


Рис. 2. Корреляционная зависимость числа определяемых в 5 независимых экспериментах пептидов Bgl2p и Pho3p в экстракте в 0,1 М Tris из КС дрожжей *S. cerevisiae* родительского штамма с помощью LC-MS/MS-анализа. Линия на графике отражает корреляцию, коэффициент корреляции – 0,94, $p < 0,01$

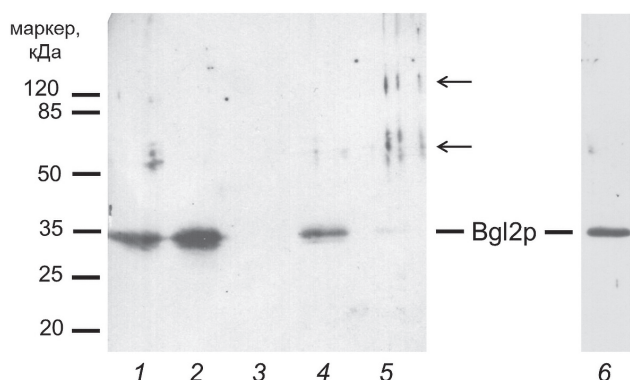


Рис. 3. Вестерн-блот анализ экстрактов из КС дрожжей *S. cerevisiae*: в буфер Лэммли – родительский штамм (дорожка 1), *Δpho3* (дорожка 2); в 6 М гуанидингидрохлорид, 2 ч экстракции – *Δpho3* (дорожка 3), родительского штамма (дорожка 4) и 4 ч экстракции – *Δpho3* (дорожка 5), родительский штамм (дорожка 6). Стрелками указаны олигомеры Bgl2p. Окрашивание антителами к Bgl2p

дрожжей на закрепление Bgl2p. Из рис. 3 видно, что фракция гуанидингидрохлорид-экстрагируемого из КС пула мономера Bgl2p практически полностью отсутствует в КС *Δpho3* при использовании условий экстракции, применяемых нами в экспериментах, позволивших выявить данный пул ранее [31], но появляются димерные и, возможно, тетрамерные формы молекул этого белка, экстракция которых наблюдается при увеличении длительности обработки КС таким же экстрагентом – нейтральным 6 М гуанидингидрохлоридом. Обнаруженный факт хорошо

согласуется с выявленными нами ранее амилоидными свойствами белка Bgl2p.

Поскольку полиР являются важным фактором устойчивости клеток дрожжей к различным видам стресса, в первую очередь к щелочному стрессу и стрессу, вызванному токсической концентрацией тяжёлых металлов [42, 44], мы сравнили устойчивость клеток всех трёх штаммов к кадмию, щёлочи и марганцу. Оказалось, что оба мутанта более устойчивы к щёлочи и марганцу, чем родительский штамм, хотя разницы в устойчивости к кадмию не отмечено (рис. 4). Итак, штамм *Δbgl2* похож на штамм *Δpho3* не только по уровню полиР4, но и по увеличению устойчивости к стрессовым воздействиям, для которой полиР КС являются важным фактором.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что делеции генов, кодирующих белки Bgl2p и Pho3p, снижают чувствительность дрожжей к некоторым стрессовым воздействиям. По-видимому, увеличенное количество полиР в случаях воздействия ионов тяжёлых металлов позволяет клеткам сорбировать некоторое количество этих ионов на клеточной поверхности, а в случае воздействия щёлочи полиР-стенки могут экранировать клетки от отрицательно заряженных гидроксил-ионов. Поскольку полиР в КС участвуют в нескольких клеточных функциях, возникает вопрос о регуляции уровня полиР в этом компартменте. Мембрана эндоплазматического ретикулюма формирует транспортные везикулы, несущие в КС белки и предшественники полисахаридов, в этой мембране присутствует VTC-комплекс, синтезирующий полиР [45]. Это позволяет предполагать, что такие транспортные везикулы могут доставлять в КС также полиР.

Следует отметить, что, несмотря на схожесть ответа дрожжей на изучаемые делеции генов *BGL2* и *PHO3* (увеличение в их КС количества полифосфатов), мы предполагали, что указанное сходство тем не менее является следствием различных процессов, идущих в метаболических путях штаммов с изучаемыми делециями, в том числе – наличия или отсутствия окислительного стресса, вызванного у дрожжей повышением содержания полифосфатов в КС.

Свидетельством верности нашего предположения могло бы явиться различное содержание 8-оксогуанозина – продукта окислительного повреждения гуанинового основания в препаратах РНК, полученных из родительского штамма и мутантных штаммов с делециями. Исследователи сравнительно давно и устойчиво используют данное соединение как маркер,

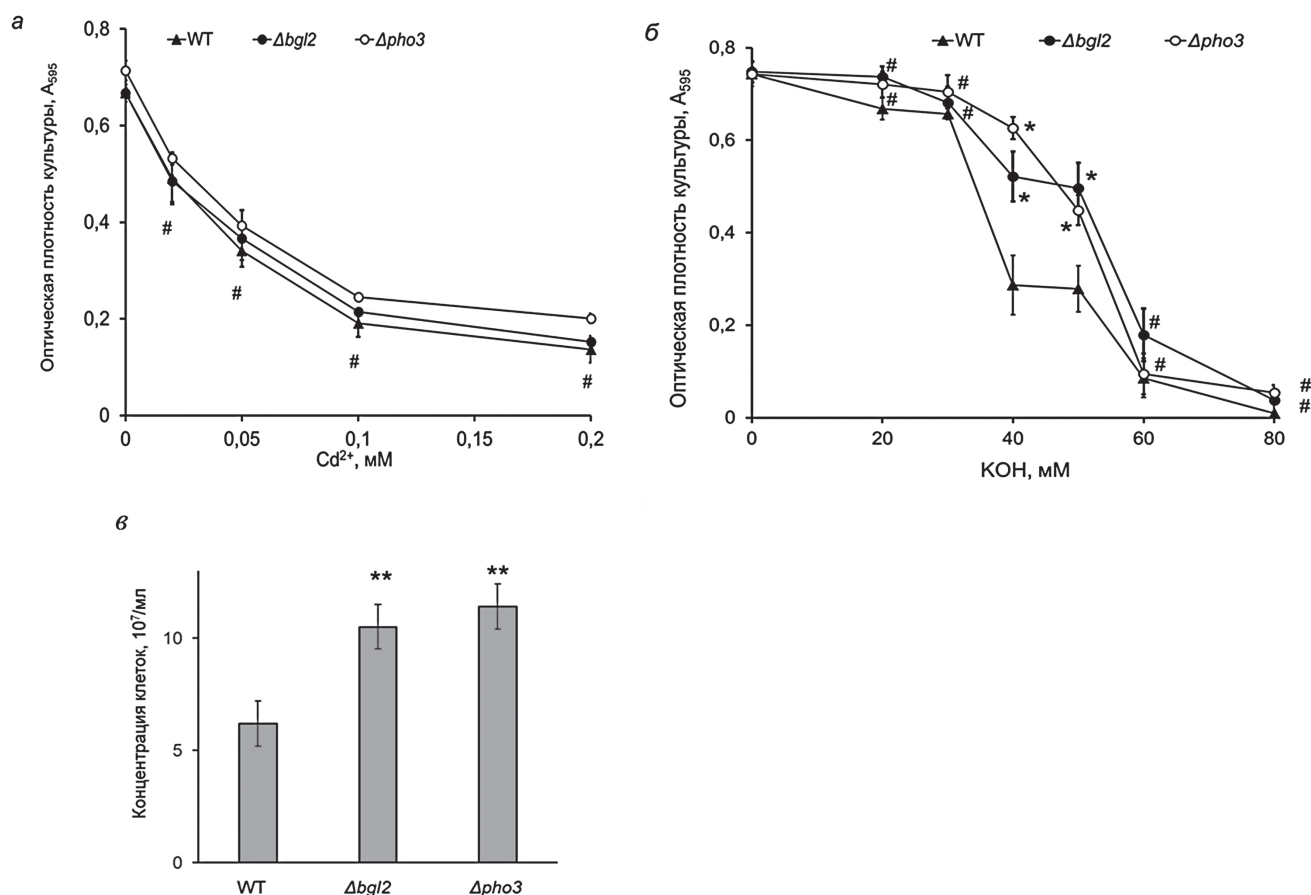


Рис. 4. Сравнение чувствительности штаммов дрожжей *S. cerevisiae* родительского штамма WT и штаммов $\Delta bgl2$ и $\Delta pho3$ к стрессовым условиям: в присутствии различных концентраций Cd^{2+} (а), KOH (б) и Mn^{2+} в концентрации 1,75 мМ (в). Представлены средние значения из 4 опытов. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, # — разница статистически незначима

определяющий уровень развития окислительного стресса у различных организмов, в том числе у высших эукариот и человека [46–48]. Работы такого направления на клетках дрожжей практически неизвестны, однако есть основания предполагать, что и у низших эукариот указанная закономерность присутствует.

Появление 8-оксогуанина в составе РНК может привести к дефектам синтеза белка, например, снижению скорости синтеза белка и продукции агрегированных или укороченных пептидов [49, 50], что у высших эукариот имеет важные последствия при старении, нейродегенеративных заболеваниях [51] и атеросклерозе [52].

Учитывая сказанное, нам представлялось необходимым определить содержание 8-оксогуанина в составе РНК изучаемых штаммов, чтобы выявить реакцию дрожжей на повышенное содержание полифосфатов в их КС.

Согласно нашим результатам, уровень 8-оксогуанозина по отношению к неокисленному гуанозину (нмоль/нмоль $\cdot 10^6$) в РНК в штамме $\Delta pho3$ не отличается от родительского штам-

ма и штамма $\Delta bgl2$ и составляет $238,5 \pm 70,26$, $178,11 \pm 70,4$ и $194,69 \pm 46,54$ соответственно.

8-оксогуанин образуется при воздействии активных форм кислорода (гидроксил-радикала [53], супероксид-анион радикала [54] и т.п.) и органических перекисей (окисленных липидов) [55] на гуанин в составе РНК. Активные формы кислорода появляются в клетке в качестве побочных продуктов электрон-транспортных цепей митохондрий и работы пероксидаз, в результате реакций перекиси водорода с катионами тяжёлых металлов [56], а также под действием некоторых факторов внешней среды, таких как ионизирующее излучение. В свою очередь, работа специфических ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы и т.п.), а также низкомолекулярных антиоксидантов снижает содержание активных форм кислорода в клетке [57].

Наши результаты можно расценивать как свидетельство об отсутствии окислительного стресса у дрожжей, у которых содержание полифосфатов в КС значительно превышает норму, или же о высокоэффективной работе

указанных выше ферментных систем и/или антиоксидантов. В дальнейшем мы продолжим исследование роли 8-оксогуанозина в ответе клеток дрожжей на стресс различного происхождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные продемонстрировали влияние изучаемых делеций на уровень высокомолекулярных щёлочерастворимых полифосфатов (полиР4) в клетках дрожжей. Мы полагаем, что наблюдаемое нами увеличение содержания полиР4 у штамма с делецией *PHO3* служит важным свидетельством в пользу гипотезы о локализации этих полиР именно в клеточной оболочке, которая является зоной локализации белков Pho3p и Bgl2p. В свою очередь, уровень полифосфатов может влиять на устойчивость дрожжей к различного рода воздействиям на их клетки соединений, вызывающих стресс.

Ранее было показано, что делеция гена кислой фосфатазы приводит к изменению прочности КС [58]. Авторы данного исследования предположили, что Pho3p является структурным белком. Однако небольшое содержание Pho3p в КС, показанное в настоящем исследовании, позволяет говорить, скорее, о регуляторной, нежели структурной роли кислой фосфатазы. В настоящем исследовании показано, что кислая фосфатаза Pho3p с очевидностью может влиять на содержание полифосфатов, гидролизую их молекулы с большей или меньшей интенсивностью. Кроме того, ранее было продемонстрировано, что полифосфаты значительно увеличивают ферментативную активность Bgl2p *in vitro* [11, 59].

Глюканозилтрансгликозилаза Bgl2p, являясь мажорным белком КС и обладая амилоидными свойствами [7, 8], может служить «посадочной площадкой» для кислой фосфатазы и, таким образом, участвовать в её закреплении и функционировании в КС. Ранее нами были

получены данные, свидетельствующие о возможном наличии таких белковых посадочных площадок в КС дрожжей [60]. Также в литературе есть данные о закреплении в КС с участием Bgl2p фермента трегалазы [61]. В свою очередь, в отсутствие кислой фосфатазы наблюдается изменение способа закрепления Bgl2p в КС. Полученные результаты в совокупности позволяют с высокой степенью вероятности предполагать, что в КС дрожжей Bgl2p и Pho3p способны образовывать метаболон или его часть, который объединяет биогенез основного структурного полимера КС — глюкана и важнейшего регуляторного полимера — полифосфатов, поскольку незначительное количество фермента кислой фосфатазы посредством накопления в КС её субстрата (полифосфатов) влияет на активность Bgl2p и, таким образом, на свойства КС.

Наличие такой взаимосвязи было предположено И.С. Кулаевым с соавт. [17–20], в нашей работе данное предположение получило развитие.

Вклад авторов. Т.С. Калебина и Т.В. Кулаковская — концепция и руководство работой; Е.В. Кулаковская, В.В. Рекстина, Л.В. Трилисенко, Р.Х. Зиганшин, Н.В. Мармий — проведение экспериментов; Т.С. Калебина, Е.В. Кулаковская, В.В. Рекстина, Д.С. Есипов, Р.Х. Зиганшин, Л.В. Трилисенко, Н.В. Мармий, Т.В. Кулаковская — обсуждение результатов исследования; Т.С. Калебина — написание текста; Т.С. Калебина, В.В. Рекстина, Д.С. Есипов, Т.В. Кулаковская — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ 20-04-01144 А. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300088-6.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было исследований с использованием в качестве объектов людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., and Arroyo, J. (2017) The CWI Pathway: regulation of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast, *J. Fungi (Basel)*, **4**, 1, doi: 10.3390/jof4010001.
2. Huang, C., Zhao, F., Lin, Y., Zheng, S., Liang, S., and Han, S. (2018) RNA-Seq analysis of global transcriptomic changes suggests a roles for the MAPK pathway and carbon metabolism in cell wall maintenance in a *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 mutant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **500**, 603–608, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.113.
3. Liu, L., and Levin, D. E. (2018) Intracellular mechanism by which genotoxic stress activates yeast SAPK Mpk1, *Mol. Biol. Cell*, **29**, 2898–2909, doi: 10.1091/mbc.E18-07-0441.
4. Molon, M., Woznicka, O., and Zebrowski, J. (2018) Cell wall biosynthesis impairment affects the budding lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast,

- Biogerontology*, **19**, 67-79, doi: 10.1007/s10522-017-9740-6.
5. Davì, V., Chevalier, L., Guo, H., Tanimoto, H., Barrett, K., Couturier, E., Boudaoud, A., and Minc, N. (2019) Systematic mapping of cell wall mechanics in the regulation of cell morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 13833-13838, doi: 10.1073/pnas.1820455116.
6. Willaert, R. G. (2018) Adhesins of yeasts: protein structure and interactions, *J. Fungi (Basel)*, **4**, 119, doi: 10.3390/jof4040119.
7. Kalebina, T. S., Plotnikova, T. A., Gorkovskii, A. A., Selyakh, I. O., Galzitskaya, O. V., Bezsonov, E. E., Gellissen, G., and Kulaev, I. S. (2008) Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences, *Prion*, **2**, 91-96, doi: 10.4161/pri.2.2.6645.
8. Bezsonov, E. E., Groenning, M., Galzitskaya, O. V., Gorkovskii, A. A., Semisotnov, G. V., Selyakh, I. O., Ziganshin, R. H., Rekstina, V. V., Kudryashova, I. B., Kuznetsov, S. A., Kulaev, I. S., and Kalebina, T. S. (2013) Amyloidogenic peptides of yeast cell wall glucantransferase Bgl2p as a model for the investigation of its pH-dependent fibril formation, *Prion*, **7**, 175-184, doi: 10.4161/pri.22992.
9. Mouyna, I., Hartl, L., and Latgé, J. P. (2013) β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*, *Front. Microbiol.*, **4**, 81, doi: 10.3389/fmicb.2013.00081.
10. Блинникова Е. И., Мирющенко Ф. Л., Шабалин Ю. А., Егоров С. Н. (2002) Везикулярный транспорт внеклеточных кислых фосфатаз у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Биохимия*, **67**, 580-586.
11. Калебина Т. С., Егоров С. Н., Арбатский Н. П., Безсонов Е. Е., Горковский А. А., Кулаев И. С. (2008) О роли высокомолекулярных полифосфатов в активации глюкантрансферазы Bgl2p из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Докл. Акад. Наук*, **420**, 695-699.
12. Weimberg, R., and Orton, W. L. (1964) Evidence for an exocellular site for the acid phosphatase of *Saccharomyces mellis*, *J. Bacteriol.*, **88**, 1743-1754, doi: 10.1128/jb.88.6.1743-1754.1964.
13. Кулаев И. С., Крашенинников И. А., Кокурина И. А. (1966) О локализации неорганических полифосфатов и нуклеотидов у *Neurospora crassa*, *Биохимия*, **31**, 850-858.
14. Tijssen, J. P. F., Beekes, H. W., and Van Steveninck, J. (1982) Localization of polyphosphate in *Saccharomyces fragilis*, as revealed by 4'6-diamidino-2-phenylindole fluorescence, *Biochem. Biophys. Acta*, **721**, 394-398, doi: 10.1016/0167-4889(82)90094-5.
15. Вагабов В. М., Чемоданова О. В., Кулаев И. С. (1990) Влияние неорганических полифосфатов на величину отрицательного заряда клеточной оболочки дрожжей, *Докл. АН СССР*, **313**, 989-992.
16. Ivanov, A. J., Vagabov, V. M., Fomchenkov, V. M., and Kulaev, I. S. (1996) Study of the influence of polyphosphates of cell envelope on the sensitivity of yeast *Saccharomyces carlsbergensis* to the cytyl-3-methylammonium bromide, *Microbiologia*, **65**, 611-616.
17. Кулаев И. С., Вагабов В. М., Циоменко А. Б. (1972) О корреляции накопления полисахаридов клеточной стенки и некоторых фракций высокомолекулярных полифосфатов у дрожжей, *Докл. АН СССР*, **204**, 734-736.
18. Циоменко А. Б., Аугустин И., Вагабов В. М., Кулаев И. С. (1974) О взаимосвязи обмена неорганических полифосфатов и маннана у дрожжей, *Докл. АН СССР*, **215**, 478-480.
19. Шабалин Ю. А., Вагабов В. М., Кулаев И. С. (1979) О механизме сопряжения биосинтеза высокомолекулярных полифосфатов и маннана у дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*, *Докл. АН СССР*, **249**, 243-246.
20. Шабалин Ю. А., Вагабов В. М., Кулаев И. С. (1985) Долихилдифосфатманноза: интермедиат биосинтеза гликопротеинов у дрожжей? *Докл. АН СССР*, **283**, 720-723.
21. Zvonarev, A. N., Crowley, D. E., Ryazanova, L. P., Lichko, L. P., Rusakova, T. G., Kulakovskaya, T. V., and Dmitriev, V. V. (2017) Cell wall canals formed upon growth of *Candida maltosa* in the presence of hexadecane are associated with polyphosphates, *FEMS Yeast Res.*, **17**, fox026, doi: 10.1093/femsyr/fox026.
22. Oshima, Y. (1997) The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gen. Genet. Syst.*, **72**, 323-334, doi: 10.1266/ggs.72.323.
23. Secco, D., Wang, C., Shou, H., and Whelan, J. (2012) Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins, *FEBS Lett.*, **586**, 289-295, doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.036.
24. Yadav, K. K., Singh, N., and Rajasekharan, R. (2016) Responses to phosphate deprivation in yeast cells, *Curr. Genet.*, **62**, 301-307, doi: 10.1007/s00294-015-0544-4.
25. Eskes, E., Deprez, M. A., Wilms, T., and Winderickx, J. (2018) pH homeostasis in yeast; the phosphate perspective, *Curr. Genet.*, **64**, 155-161, doi: 10.1007/s00294-017-0743-2.
26. Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H., and Iwashima, A. (1989) A possible role for acid phosphatase with thiamin-binding activity encoded by *PHO3* in yeast, *FEMS Microbiol. Lett.*, **51**, 55-59, doi: 10.1016/0378-1097(89)90077-3.
27. Nosaka, K. (1990) High affinity of acid phosphatase encoded by *PHO3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* for thiamin phosphates, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1037**, 147-154, doi: 10.1016/0167-4838(90)90160-h.
28. Kennedy, E. J., Pillus, L., and Ghosh, G. (2005) Pho5p and newly identified nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases regulate extracellular nucleotide phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryot. Cell*, **4**, 1892-1901, doi: 10.1128/EC.4.11.1892-1901.2005.

29. Andreeva, N., Ledova, L., Ryasanova, L., Kulakovskaya, T., and Eldarov, M. (2019) The acid phosphatase Pho5 of *Saccharomyces cerevisiae* is not involved in polyphosphate breakdown, *Folia Microbiol. (Praha)*, **64**, 867-873, doi: 10.1007/s12223-019-00702-6.
30. Рекстина В. В., Безсонов Е. Е. (2012) Влияние неорганических полифосфатов на конформацию пептида АК187-196 глюкантрасферазы Bgl2p – амилоида клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae*. «Ломоносов-2012»: МАКС Пресс, Москва, с. 191.
31. Rekstina, V. V., Sabirzyanova, T. A., Sabirzyanov, F. A., Adzhubei, A. A., Tkachev, Y. V., Kudryashova, I. B., Snalina, N. E., Bykova, A. A., Alessenko, A. V., Ziganshin, R. H., Kuznetsov, S. A., and Kalebina, T. S. (2020) The post-translational modifications, localization, and mode of attachment of non-covalently bound glucanotransglycosylases of yeast cell wall as a key to understanding their functioning, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8304, doi: 10.3390/ijms21218304.
32. Sherman, F. (2002) Getting started with yeast, *Methods Enzymol.*, **350**, 3-41, doi: 10.1016/s0076-687950954-x.
33. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure, *Yeast*, **11**, 355-360, doi: 10.1002/yea.320110408.
34. Gietz, R. D., and Schiestl, R. H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method, *Nat. Protoc.*, **2**, 31-34, doi: 10.1038/nprot.2007.13.
35. Вагабов В. М., Трилисено Л. В., Кулаев И. С. (2000) Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей, *Биохимия*, **65**, 414-420.
36. Vagabov, V. M., Trilisenko, L. V., Kulakovskaya, T. V., and Kulaev, I. S. (2008) Effect of a carbon source on polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, **8**, 877-882, doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00420.x.
37. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
38. Mruk, D. D., and Cheng, C. Y. (2011) Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting, *Spermatogenesis*, **1**, 121-122, doi: 10.4161/spmg.1.2.16606.
39. Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014) Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells, *Nat. Methods*, **3**, 319-324, doi: 10.1038/nmeth.2834.
40. Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, New York.
41. Kulaev, I. S. (1979) *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*, 1st Edn, Wiley.
42. Andreeva, N., Ryasanova, L., Dmitriev, V., Kulakovskaya, T., and Kulaev, I. (2013) Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to toxic manganese concentration triggers changes in inorganic polyphosphates, *FEMS Yeast Res.*, **13**, 463-470, doi: 10.1111/1567-1364.12049.
43. Andreeva, N., Ryasanova, L., Dmitriev, V., Kulakovskaya, T., and Kulaev, I. (2014) Cytoplasmic inorganic polyphosphate participates in the heavy metal tolerance of *Cryptococcus humicola*, *Folia Microbiol. (Praha)*, **59**, 381-389, doi: 10.1007/s12223-014-0310-x.
44. Trilisenko, L. V., Kulakovskaya, E. V., and Kulakovskaya, T. V. (2017) The cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* depends on inorganic polyphosphate, *J. Basic Microbiol.*, **57**, 982-986, doi: 10.1002/jobm.201700257.
45. Gerasimaitė, R., and Mayer, A. (2016) Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles, *Biochem. Soc. Trans.*, **44**, 234-239, doi: 10.1042/BST20150213.
46. Mundt, J. M., Hah, S. S., Sumbad, R. A., Schramm, V., and Henderson, P. T. (2008) Incorporation of extracellular 8-oxodG into DNA and RNA requires purine nucleoside phosphorylase in MCF-7 cells, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 228-236, doi: 10.1093/nar/gkm1032.
47. Doi, K., and Uetsuka, K. (2011) Mechanisms of mycotoxin-induced neurotoxicity through oxidative stress-associated pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 5213-5237, doi: 10.3390/ijms12085213.
48. Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., and Reshi, M. S. (2022) Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives, *Cells*, **11**, 552, doi: 10.3390/cells11030552.
49. Shan, X., Chang, Y., and Lin, C. G. (2007) Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression, *FASEB J.*, **21**, 2753-2764, doi: 10.1096/fj.07-8200com.
50. Tanaka, M., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. (2007) Oxidized messenger RNA induces translation errors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 66-71, doi: 10.1073/pnas.0609737104.
51. Nunomura, A., Honda, K., Takeda, A., Hirai, K., Zhu, X., Smith, M. A., and Perry, G. (2006) Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2006**, 82323, doi: 10.1155/JBB/2006/82323.
52. Martinet, W., de Meyer, G. R. Y., Herman, A. G., and Kockx, M. M. (2004) Reactive oxygen species induce RNA damage in human atherosclerosis, *Eur. J. Clin. Invest.*, **34**, 323-327, doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01343.x.
53. Liu, M., Gong, X., Alluri, R. K., Wu, J., Sablo, T., and Li, Z. (2012) Characterization of RNA damage under oxidative stress in *Escherichia coli*, *Biol. Chem.*, **393**, 123-132, doi: 10.1515/hsz-2011-0247.
54. Nakatsu, Y., and Sekiguchi, M. (2006) *Oxidative Damage to Nucleotide: Consequences and Preventive Mechanisms*, in *Oxidative Stress, Disease and Cancer*

- (Singh, K. K., ed.) Imperial College Press, London, pp. 221-252.
55. Kanazawa, K., Sakamoto, M., Kanazawa, K., Ishigaki, Y., Aihara, Y., Hashimoto, T., and Mizuno, M. (2016) Lipid peroxides as endogenous oxidants forming 8-oxo-guanosine and lipid soluble antioxidants as suppressing agents, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **59**, 16-24, doi: 10.3164/jcbn.15-122.
 56. Estevez, M., Valesyan, S., Jora, M., Limbach, P. A., and Addepalli, B. (2021) Oxidative damage to RNA is altered by the presence of interacting proteins or modified nucleosides, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 697149, doi: 10.3389/fmolb.2021.697149.
 57. Jones, D. P. (2008) Radical-free biology of oxidative stress, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **295**, C849-868, doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008.
 58. Егоров С. Н., Семенова И. Н., Максимов В. Н. (2000) Взаимное влияние инвертазы и кислой фосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на их секрецию в среду культивирования, *Микробиология (Москва)*, **69**, 34-37.
 59. Горковский А.А. (2009) *Выявление и частичная характеристика белков клеточной стенки дрожжей Saccharomyces cerevisiae, обладающих свойствами амилоидов*. Дис. канд. биол. наук. ИБФМ, Пушкино.
 60. Kalebina, T. S., Laurinavichiute, D. K., Packeiser, A. N., Morenkov, O. S., Ter-Avanesyan, M. D., and Kulaev, I. S. (2002) Correct GPI-anchor synthesis is required for the incorporation of endoglucanase/glucanoyltransferase Bgl2p into the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, *FEMS Microbiol. Lett.*, **210**, 81-85, doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11163.x.
 61. Basu, A., Chaudhuri, P., Malakar, D., and Ghosh, A. K. (2007) Co-purification of glucanase with acid trehalase-invertase aggregate in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 299-304, doi: 10.1007/s10529-007-9535-y.

THE EFFECT OF DELETIONS OF GENES ENCODING Pho3p AND Bgl2p ON THE POLYPHOSPHATE LEVEL, STRESS ADAPTATION AND ATTACHMENT OF THESE PROTEINS IN *Saccharomyces cerevisiae* CELL WALL

T. S. Kalebina^{1*}, E. V. Kulakovskaya², V. V. Rekstina¹, L. V. Trilisenko², R. H. Ziganshin³,
N. V. Marmiy⁴, D. S. Esipov⁵, and T. V. Kulakovskaya²

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Molecular Biology, 119234 Moscow, Russia; e-mail: kalebina@gmail.com

² Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290 Pushchino, Russia

³ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

⁴ Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Bioorganic Chemistry, 119234 Moscow, Russia

Inorganic polyphosphates (polyP), according to literature data, are involved in the regulatory processes of molecular complex of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall (CW). The aim of the work was to reveal relationship between polyP, acid phosphatase Pho3p, and the major CW protein, glucanoyl transglycosylase Bgl2p, which is the main glucan-remodelling enzyme with amyloid properties. It has been shown that the yeast cells with deletion of the *PHO3* gene contain more high molecular alkali-soluble polyP and are also more resistant to exposure to alkali and manganese ions compared to the wild type strain. This suggests that Pho3p is responsible for hydrolysis of the high molecular polyP on the surface of yeast cells, and these polyP belong to the stress resistance factors. The *S. cerevisiae* strain with deletion of the *BGL2* gene is similar to the Δ *pho3* strain both in the level of high molecular alkali-soluble polyP and in the increased resistance to alkali and manganese. Comparative analysis of the CW proteins demonstrated correlation between the extractability of the acid phosphatase and Bgl2p, and also revealed a change in the mode of Bgl2p attachment to the CW of the strain lacking Pho3p. It has been suggested that Bgl2p and Pho3p are able to form a metabolon or its parts that connects biogenesis of the main structural polymer of the CW, glucan, and catabolism of an important regulatory polymer, polyphosphates.

Keywords: yeast, cell wall, polyphosphates, acid phosphatase, glucanoyltransglycosylase, Pho3p, Bgl2p, stress