

УДК 577.152.313

## ПОЛИФОСФАТЫ И ПОЛИФОСФАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae* ПРИ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА *DDP1*

© 2015 Л.В. Трилисенко<sup>1</sup>, Н.А. Андреева<sup>1</sup>,  
М.А. Эльдаров<sup>2</sup>, М.В. Думина<sup>2</sup>, Т.В. Кулаковская<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К. Скрябина РАН, 142290 Пущино Московской обл.,  
пр. Науки, 5; факс: +7(495)956-3370,  
электронная почта: alla@ibp.pushchino.ru

<sup>2</sup> Центр «Биоинженерия» РАН, 117312 Москва,  
проспект 60-летия Октября, 7, корп. 1

Поступила в редакцию 24.04.15

После доработки 20.05.15

Исследовано влияние сверхэкспрессии дрожжевой дифосфоинозитол-полифосфатфосфогидролазы DDP1, обладающей эндополифосфатазной активностью, на метаболизм неорганических полифосфатов у *Saccharomyces cerevisiae*. Эндополифосфатазная активность у штамма-трансформанта значительно увеличилась по сравнению с исходным штаммом. Эта активность проявлялась с полифосфатами различной длины и подавлялась 2 мМ триполифосфатом и АТР. Содержание кислоторастворимых и кислотонерастворимых полифосфатов снизилось у трансформанта на 9 и 28% соответственно. При культивировании трансформанта в среде с избытком фосфата средняя длина цепи солерастворимой и щелочерастворимой фракций полифосфатов не изменялась, а кислоторастворимой фракции — увеличилась. На начальном этапе восстановления уровня полифосфатов после фосфорного голодания длина цепи кислоторастворимых полифосфатов у трансформанта ниже, чем у исходного штамма. Полученные данные свидетельствуют о сложном характере участия DDP1 в регуляции содержания и длины цепи неорганических полифосфатов у дрожжей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** полифосфат, дифосфоинозитолпентакисфосфат, бис(дифосфоинозитол)тетракисфосфат, полифосфатаза, ген *DDP1*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Некоторые ферменты, участвующие в обмене неорганических полифосфатов (полиР), являются полифункциональными и способны катализировать реакции с участием вторичных сигнальных соединений [1, 2]. Одна из экзополифосфатаз бактерий, кодируемая геном *gppA*, отщепляет  $P_i$  от гуанозин-5'-трифосфата-3'-дифосфата ( $pppGpp$ ) и гуанозин-5'-дифосфата-3'-дифосфата ( $ppGpp$ ) [3]. Эти соединения, так называемые алармоны, участвуют в стрессовых реакциях у бактерий [4, 5]. ПолиР подавляют гидролиз этих соединений ферментом *gppA*, а увеличение концентрации этих сигнальных молекул приводит в свою очередь к подавлению гидролиза полиР также и другой полифосфатазой, *ppx*. Эти эффекты при аминокислотном голодании приводят к увеличению уровня полиР, связыва-

нию их с АТР-зависимой Lon-протеазой и увеличению ее активности [5]. Эта протеаза гидролизует рибосомальные белки, а образующиеся аминокислоты используются для синтеза ферментов анаболизма аминокислот [5]. У дрожжей и млекопитающих системы ( $p$ ) $ppGpp$  не обнаружено. Однако у них имеются инозитолполифосфаты, которые вовлечены в регуляцию везикулярного транспорта, апоптоза и других клеточных процессов [6, 7]. Фермент, расщепляющий макроэргическую фосфоэфирную связь этих соединений, дифосфоинозитол-полифосфатфосфогидролаза (DDP1, КФ 3.6.1.52), имеется у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q99321>). У DDP1 есть три гомолога в клетках человека — это так называемые Nudix-гидролазы [6]. ПолиР участвуют в развитии костной ткани, каскаде свертывания крови, воспалении и других процессах в организме человека [8], поэтому изучение ферментов их метаболизма и гомологичных белков у низших эукариот представляет существенный интерес. Фермент DDP1 также является диад-

Принятые сокращения: полиР — неорганические полифосфаты, DDP1 — дифосфоинозитол-полифосфатфосфогидролаза,  $P_i$  — неорганический фосфат,  $PP_i$  — пирофосфат.

\* Адресат для корреспонденции.

нозингексафосфатгидролазой и проявляет эндополифосфатазную активность [6]. Вопрос о взаимосвязи обмена инозитолпирофосфата и полиР представляется сложным. У делеционно-го мутанта по *DDP1* уровень инозитолпирофосфата увеличен вдвое, а уровень полиР снижен [6]. У мутантных штаммов *S. cerevisiae*, не способных синтезировать инозитолпирофосфат, уровень полиР снижен еще в большей степени [6].

Целью настоящей работы была оценка влияния сверхэкспрессии гена *DDP1* на метаболизм полиР у *S. cerevisiae*.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Штаммы дрожжей и условия культивирования.

Штамм CRN с инактивированным геном *PPN1* был получен из лаборатории А. Корнберга [9]. Штамм-трансформант получали согласно методу, подробно описанному ранее [10]. Создание экспрессионного вектора рМВ1 с «кассетой экспрессии», состоявшей из сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*PGK1*) и терминатора фосфоглицераткиназы (*TDH*) *S. cerevisiae*, описано в той же работе [10]. Для конструирования вектора экспрессии *DDP1* в вектор рМВ1 встраивали фрагмент, кодирующий полноразмерный ген *DDP1 S. cerevisiae* с открытой рамкой считывания, соответствующей гену YOR163W (GenBank NM\_001183582). На матрице геномной ДНК штамма CRY с использованием праймеров *DDP1\_F* (GGT CCA TGG GCA AAA CCG CGG ATA ATC ATG G) и *DDP1\_R* (GGT CTC GAG STA TTT GTC GTC TTT AAT GAT AGC AG) получали уникальный ПЦР-фрагмент размером 580 п.н. 5'-Фланкирующие последовательности этих праймеров содержали сайты *PciI* и *XhoI* для последующего клонирования фрагментов ПЦР. Фрагмент очищали, обрабатывали совместно рестриктазами *VspHI/XhoI* и встраивали в *NcoI/XhoI*-вектор рМВ1. Вставку гена *DDP1* в отобранных клонх секвенировали и отбирали клон без неспецифических ПЦР-мутаций, обозначенный рМВ1/*DDP1 Sc*. Для секвенирования гена использовали дополнительные олигонуклеотиды. ДНК-манипуляции (выделение плазмидной ДНК, очистка фрагментов ДНК, гидролиз ДНК рестриктазами, лигирование фрагментов ДНК, ПЦР, сайт-направленный мутагенез) проводили с помощью наборов и ферментов производства «СибЭнзим» (Россия), «Fermentas МВ1» (Литва) и «Stratagene» (США) в соответствии с рекомендациями фирм-производителей. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора *ABI BigDye3.1 Sequencing Kit*

(«Applied Biosystems», США) согласно протоколу производителя на приборе *ABI3730* («SeqGen», США).

Штамм CRN трансформировали плазмидой рМВ1/*DDP1 Sc*, используя обработку ацетатом лития [11]. Клоны-трансформанты отбирали на чашках Петри на минимальной среде без урацила, поскольку плазмида содержала ген *URA3*. Трансформанты проверяли на наличие вектора с помощью ПЦР.

Штамм CRN поддерживали на агаризованной среде YPD, а трансформант – на агаризованной синтетической минимальной среде YNB без урацила [10]. Для получения биомассы культуры выращивали при 29° в колбах с 200 мл среды YNB с 8,2 мМ  $P_i$  на качалке при 145 об/мин. Биомассу собирали центрифугированием при 3000 g, дважды промывали холодной дистиллированной водой.

Для исследования того, как полиР накапливаются после фосфорного голодания, дрожжи культивировали в течение 24 ч в  $P_i$ -дефицитной среде YNB с 0,05 мМ  $P_i$  [12]. Затем клетки переносили в среду YNB, содержащую 8,2 мМ  $P_i$ , культивировали в течение 1 ч, отделяли центрифугированием, дважды промывали дистиллированной водой и использовали для экстракции полиР.

**Получение сферопластов и бесклеточного экстракта.** Для получения сферопластов биомассу промывали 0,8 М раствором маннита в цитратном буфере (к 5%-ному цитрату натрия добавляли лимонную кислоту до 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°. Сферопласты промывали тем же буфером и разрушали при 4° в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 50 мМ Tris-HCl, pH 7,2, содержащем 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторид («Sigma», США). Затем центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин. К осадку снова добавляли этот же буфер, обрабатывали в гомогенизаторе и центрифугировали при тех же условиях. Объединенный супернатант центрифугировали при 13 000 g в течение 60 мин. Супернатант представлял собой бесклеточный экстракт, а осадок – грубую мембранную фракцию.

**Определение полифосфатазных активностей.** Экзополифосфатазную активность определяли при 30° по скорости образования  $P_i$  [10]. Инкубационная среда содержала 50 мМ Tris-HCl, pH 7,2, 2,5 мМ  $MgSO_4$  и 200 мМ  $NH_4Cl$ . В качестве субстратов использовали 2,5 мМ полиР со средней длиной цепи 208 фосфатных остатков (полиР<sub>208</sub>) или 15 фосфатных остатков (полиР<sub>15</sub>)

(«Monsanto», США). Концентрация полиР указана в соответствии с количеством  $P_i$ , образующимся при гидролизе полимера в 1 N HCl при 100° за 10 мин. ПолиР предварительно очищали от примесей пирофосфата и ортофосфата, как описано ранее [13]. Использовали также триполифосфат («Sigma», США) и  $PP_i$  («Koch-Light», Великобритания) в концентрации 2,5 мМ.

За единицу активности (Е) в случае экзополифосфатазной активности принимали количество фермента, образующего 1 мкмоль  $P_i$  за 1 мин. Концентрацию белка определяли с использованием БСА в качестве стандарта [14].

Эндополифосфатазную активность анализировали по уменьшению длины цепи полифосфатов (поли $P_{208}$  и поли $P_{15}$ ). Инкубационная среда (0,5–1 мл) содержала 50 мМ Tris-HCl, pH 7,2, 200 мМ  $NH_4Cl$ , 2,5 мМ  $MgSO_4$ , 9 мМ поли $P_{208}$  либо 6,8 мМ поли $P_{15}$ . Препараты бесклеточного экстракта добавляли из расчета 0,16 мг белка на 1 мл смеси. Реакцию останавливали добавлением концентрированной  $HClO_4$  до 0,5 N. Дальнейшую подготовку образцов и электрофорез в 24%-ном ПААГ с 7 М мочевиной проводили, как описано ранее [15].

**Определение содержания полифосфатов в клетках.** Для экстракции полиР применяли известный метод [16] с некоторыми модификациями. Кислоторастворимую фракцию полиР получали двукратной обработкой биомассы 0,5 N  $HClO_4$  при 0° в течение 15 мин при перемешивании. После отделения супернатанта оставшуюся биомассу дважды обрабатывали насыщенным раствором  $NaClO_4$  при 0°, супернатант после центрифугирования представлял собой солерастворимую фракцию полиР. Осадок дважды обрабатывали 0,05 М NaOH, супернатант представлял собой щелочерастворимую фракцию. В полученных фракциях содержание полиР оценивали по лабильному фосфору [16]. Количество оставшихся в биомассе полиР оценивали по содержанию  $P_i$  после обработки оставшейся биомассы 0,5 N  $HClO_4$  при 90° в течение 20 мин [16].  $P_i$  определяли колориметрически согласно методу Хайнонен с соавт. [17]. Для оценки длины цепи полиР использовали электрофорез в 24%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины, гели окрашивали толуидиновым голубым [18].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Полифосфатазная активность при сверхэкспрессии гена *DDP1*.** Наличие экспрессионного вектора, содержащего ген *DDP1*, привело к снижению выхода биомассы на стационарной стадии роста при культивировании в среде YNB. Выход

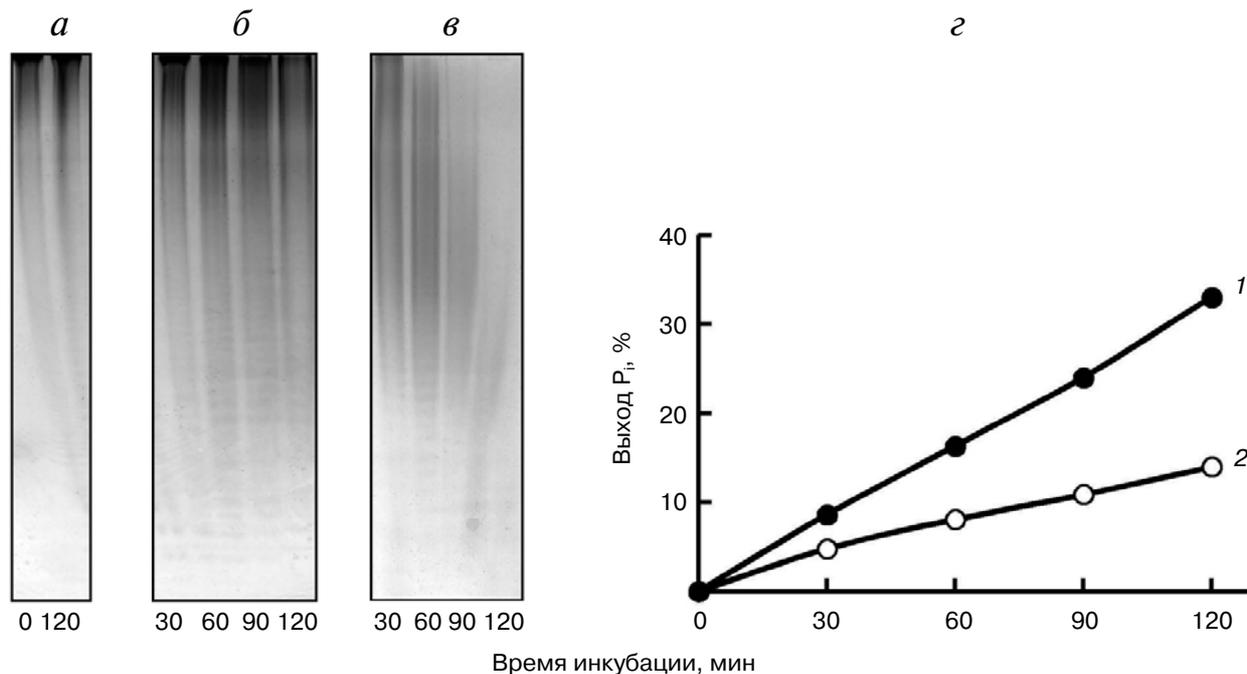
биомассы штамма-трансформанта CRN/pMB1\_ DDP1 Sc и исходного штамма CRN составлял 3,7 и 4,5 г/л соответственно.

Известно, что фермент *DDP1* проявляет эндополифосфатазную активность [6]. Мы сравнили эндополифосфатазные активности бесклеточного экстракта исходного штамма CRN и штамма-трансформанта, оценивая их по уменьшению длины цепи поли $P_{208}$ . Эндополифосфатазная активность в бесклеточном экстракте трансформанта ожидаемо увеличилась (рис. 1, *a–в*). У исходного штамма CRN отсутствует эндополифосфатаза *PPN1* [9], но имеется собственный белок *DDP1*, что и объясняет небольшую эндополифосфатазную активность у этого штамма.

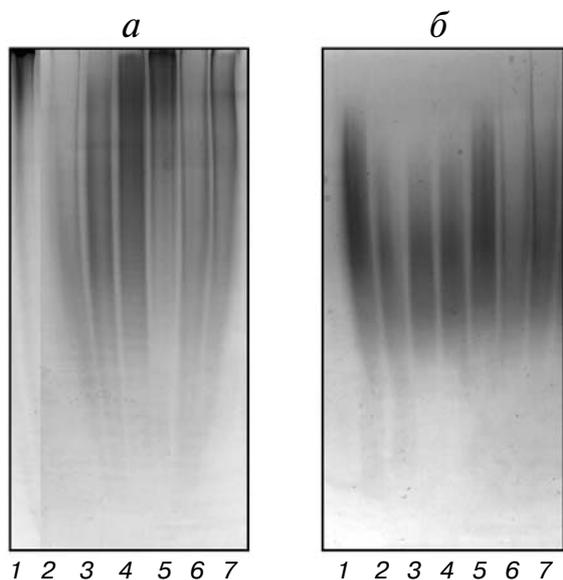
В литературе не имеется данных о проявлении *DDP1* экзополифосфатазной активности. В бесклеточном экстракте штамма-трансформанта экзополифосфатазная активность с поли $P_{208}$  и поли $P_{15}$  была в ~2 раза выше, чем у исходного штамма (рис. 1, *г* и таблица). Экзополифосфатазная активность в мембранной фракции у обоих штаммов была одинакова (0,046 Е на 1 мг белка). Это согласуется с литературными данными о локализации *DDP1* в цитоплазме [6, 7]. Пирофосфатазная и триполифосфатазная активности бесклеточного экстракта при трансформации не изменились (таблица).

Мы определили некоторые свойства эндополифосфатазной и экзополифосфатазной активностей бесклеточного экстракта штамма-трансформанта CRN/pMB1\_ DDP1 Sc. Эндополифосфатазная активность трансформанта проявлялась как с длинноцепочечными поли $P_{208}$ , так и с короткоцепочечными поли $P_{15}$  (рис. 2).  $P_i$ ,  $PP_i$ , триполифосфат и АТФ в концентрации 2 мМ подавляли эту активность в разной степени (рис. 2). ADP не влиял на эту активность. Увеличение концентрации ионов магния до 10 мМ не приводило к увеличению эндополифосфатазной и экзополифосфатазной активностей. Обе активности в присутствии 2,5 мМ  $Mg^{2+}$  были выше, чем в присутствии 0,1 мМ  $Co^{2+}$  (данные не представлены).

**Полифосфаты при сверхэкспрессии гена *DDP1*.** На стационарной стадии роста в среде с избытком  $P_i$  содержание полиР в клетках исходного штамма CRN и штамма-трансформанта составило 105 и 81 мкмоль Р на 1 г сырой биомассы соответственно. Содержание  $P_i$  в клетках штамма-трансформанта было выше (рис. 3). Снижение содержания кислоторастворимых полиР и суммы остальных фракций у трансформанта составило 9 и 28% соответственно (рис. 3, *a*). Длина цепи кислоторастворимых полиР у штамма-трансформанта оказалась выше, чем у исходного штамма как на логарифмической (рис. 4, *a*),



**Рис. 1.** Гидролиз поли $P_{208}$  бесклеточными экстрактами штаммов CRN и CRN/pMB1\_DDP1 Sc. *a–в* – Электрофореграммы полиP в 24%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины. *a* – Контроль, поли $P_{208}$  без экстрактов; *б* – экстракт штамма CRN; *в* – экстракт штамма CRN/pMB1\_DDP1 Sc. Цифры под электрофореграммами обозначают время инкубации, мин; *z* – образование  $P_i$  при гидролизе препаратами бесклеточных экстрактов штамма-трансформанта CRN/pMB1\_DDP1 Sc (1) и штамма CRN (2), % от содержания фосфора в поли $P_{208}$



**Рис. 2.** Влияние фосфорных соединений на эндополифосфатазную активность препарата бесклеточного экстракта штамма CRN/pMB1\_DDP1 Sc: *a* – поли $P_{208}$ , *б* – поли $P_{15}$ . ПолиP подвергали электрофорезу в 24%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины. Концентрация всех эффекторов – 2 мМ, время инкубации – 1 ч. 1 – Контроль, 2–7 – в присутствии бесклеточного экстракта; 2 – без эффекторов, 3 –  $P_i$ , 4 –  $PP_i$ , 5 – триполифосфат, 6 – ADP, 7 – ATP

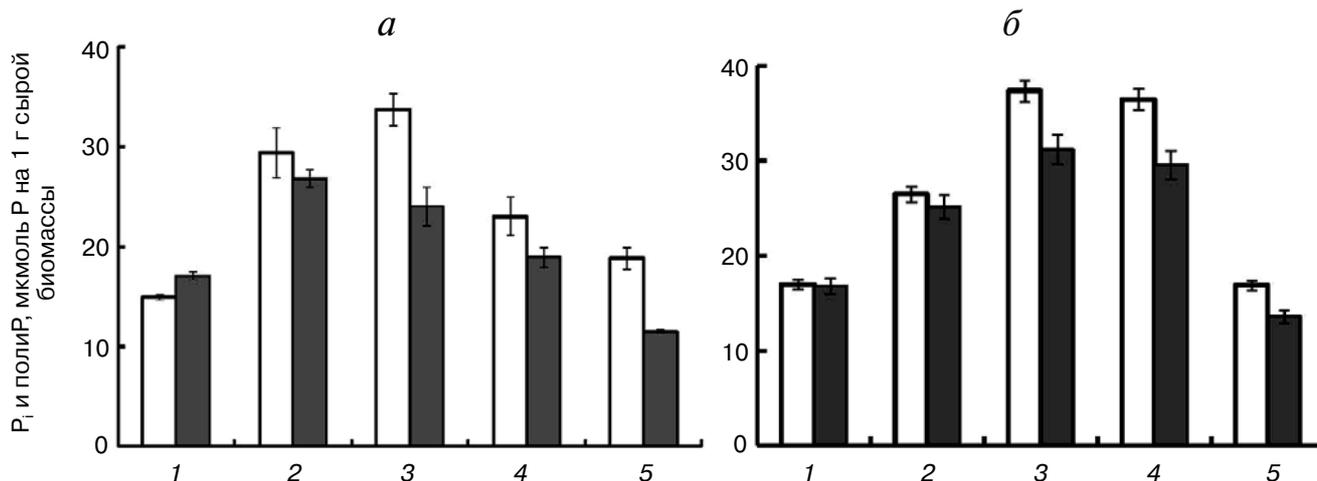
так и на стационарной стадии роста (рис. 4, б). При этом длина цепи солерастворимых и щелочерастворимых полиP (рис. 4, б) не изменилась по сравнению с исходным штаммом.

Штамм-трансформант рос при дефиците  $P_i$  так же, как и в полноценной среде. В условиях фосфорного голодания количество полиP у обоих штаммов снизилось до 12–13 мкмоль P на 1 г сырой биомассы. При последующем культивировании на полноценной среде у обоих штам-

Фосфогидролазные активности в бесклеточном экстракте штаммов *S. cerevisiae*

Субстрат	Удельная активность, Е/мг	
	CRN	CRN/pMB1_DDP1 Sc
Поли $P_{208}$	0,12 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Поли $P_{15}$	0,21 ± 0,03	0,55 ± 0,05
Триполифосфат	0,66 ± 0,02	0,70 ± 0,02
$PP_i$	1,46 ± 0,05	1,57 ± 0,15

Примечание. Представлены средние результаты из трех независимых опытов.

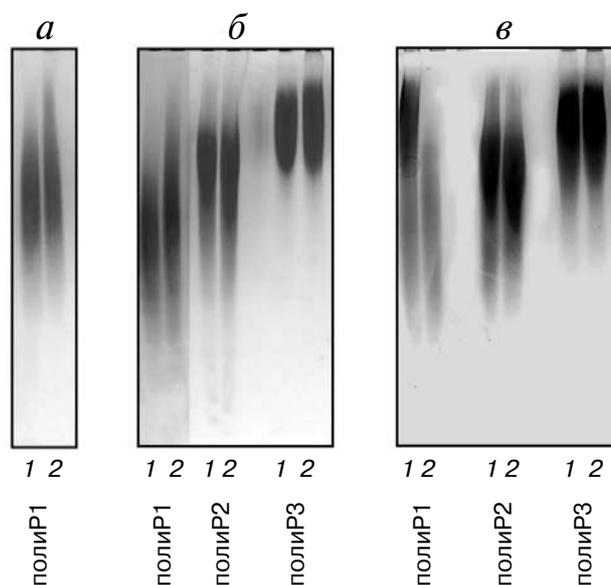


**Рис. 3.** Содержание  $P_i$  и полиР в клетках штамма CRN (белые столбцы) и CRN/pMB1\_DDP1 Sc (черные столбцы) на стационарной стадии роста в среде с 8,2 мМ  $P_i$  (а) и через 1 ч культивирования в среде с 8,2 мМ  $P_i$  после фосфорного голодания (б). 1 –  $P_i$ , 2 – кислоторастворимые полиР, 3 – солерастворимые полиР, 4 – щелочерастворимые полиР, 5 – полиР горячего хлорноокислого экстракта

мов за 1 ч произошло восстановление уровня полиР (рис. 3, б). При этом содержание кислоторастворимых полиР у обоих штаммов отличалось незначительно. Снижение содержания остальных фракций полиР у трансформанта было близким к наблюдаемому при обычном культивировании (рис. 3, а и б). Длину цепи полиР в указанных условиях оценивали с помощью электрофореза в ПААГ. Средняя длина цепи полиР солерастворимой и щелочерастворимой фракций (рис. 4, в) у обоих штаммов была одинаковой, так же как и при обычном культивировании (рис. 4, б). Что касается кислоторастворимых полиР, то у трансформанта в этих условиях они значительно короче по сравнению с исходным штаммом (рис. 4, в) и сходны по длине цепи с кислоторастворимыми полиР дикого штамма *S. cerevisiae* ВКМ У-1173 [18]. Таким образом, при сверхэкспрессии *DDP1* изменилась зависимость длины цепи кислоторастворимых полиР от условий культивирования.

Во всех изученных нами условиях сверхэкспрессия *DDP1* привела к снижению содержания полиР, однако этот эффект неодинаков для различных фракций. Снижение содержания более длинноцепочечных фракций хорошо согласуется с наличием у этого фермента эндополифосфатазной активности. Влияние сверхэкспрессии *DDP1* на длину цепи кислоторастворимых полиР неоднозначно и зависит от условий культивирования. При избытке  $P_i$  наблюдали увеличение длины цепи этой фракции. В условиях быстрого накопления полиР после фосфорного голодания длина цепи этой фракции

оказывается ниже, чем у исходного штамма. О причинах увеличения длины цепи кислоторастворимых полиР при сверхэкспрессии *DDP1* мож-



**Рис. 4.** Электрофореграммы полиР из клеток штаммов CRN (1) и CRN/pMB1\_DDP1 Sc (2): а – клетки культивировали в среде YNB с 8,2 мМ  $P_i$  до логарифмической стадии роста; б – клетки культивировали в среде YNB с 8,2 мМ  $P_i$  до стационарной стадии роста; в – клетки, выращенные в среде YNB с 0,05 мМ  $P_i$ , переносили в среду YNB с 8,2 мМ  $P_i$  и культивировали 1 ч. ПолиР1 – кислоторастворимые полиР, полиР2 – солерастворимые полиР, полиР3 – щелочерастворимые полиР

но сделать только несколько предположений. Не исключено, что фермент способен катализировать обратную реакцию соединения цепей полиР. Сверхэкспрессия *DDP1*, вероятно, приводит к снижению уровня дифосфоинозитолпентакисфосфата и бис(дифосфоинозитол)тетраакисфосфата в клетке. Не исключено, что эти соединения участвуют в регуляции синтеза и деградации полиР.

У дрожжей *S. cerevisiae* есть три негомолочных гена, кодирующие ферменты катаболизма полиР: *PPX1* (<http://www.uniprot.org/uniprot/P38698>), *PPN1* (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q04119>) и *DDP1* (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q99321>). *PPX1* является экзополифосфатазой, отщепляющей  $P_i$  от конца цепи полимера [13, 19, 20]. *PPN1* проявляет как экзо-, так и эндополифосфатазную активности [9, 15], а *DDP1* — эндополифосфатазную активность [6]. Вопрос об экзополифосфатазной активности *DDP1* пока остается нерешенным. Увеличение экзополифосфатазной активности, наблюдаемое при сверхэкспрессии этого белка, слабо выражено по сравнению со случаями сверхэкспрессии *PPX1* или *PPN1* при использовании такой же генетической конструкции [10, 21]. Увеличение эндополифосфатазной активности у штамма-трансформанта несомненно связано со сверхэкспрессией *DDP1*, поскольку исходный штамм является делеционным мутантом по гену *PPN1*. Эндополифосфатаза, выявленная у двойного делеционного мутанта по генам *PPX1* и *PPN1* [22], сходна с *DDP1* по способности фрагменти-

ровать полиР разной длины цепи и потребности в двухвалентных катионах [6]. Вполне возможно, что эта эндополифосфатаза кодируется геном *DDP1*.

Данные о влиянии сверхэкспрессии трех белков (*PPX1* [21], *PPN1* [10] и *DDP1*), обладающих полифосфатазной активностью, позволяют предполагать неодинаковую роль этих ферментов в катаболизме полиР. Сверхэкспрессия *PPX1* не оказала влияния на содержание полиР [21], а сверхэкспрессия *PPN1* привела к снижению содержания полиР почти втрое [10, 23] независимо от условий культивирования. При сверхэкспрессии *DDP1* содержание полиР снижается на ~23%, в первую очередь это касается длинно-цепочечных фракций. Интересно отметить, что АТФ ингибирует эндополифосфатазную активность и *PPN1* [15], и *DDP1*. Это позволяет предполагать наличие регуляторного механизма, обеспечивающего использование полиР в качестве резерва энергии при снижении концентрации АТФ.

Делеционные мутанты  $\Delta PPX1$ ,  $\Delta PPN1$  и двойной мутант  $\Delta PPX1\Delta PPN1$  растут в среде, лимитированной по  $P_i$ , и расходуют полиР так же, как родительский штамм [24]. Поэтому представляется вероятным, что любой из трех ферментов способен супрессировать отсутствие других для использования полиР как резерва фосфора в данных условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-00515).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., and Kulakovskaya, T.V. (2004) *The biochemistry of inorganic polyphosphates*, Wiley & Sons, N.Y.
2. Rao, N.N., Gomez-Garcia, M.R., and Kornberg, A. (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 605–647.
3. Keasling, J.D., Bertsh, L., and Kornberg, A. (1993) Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7029–7033.
4. Magnusson, L.U., Farewell, A., and Nystrom, T. (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*, *Trends Microbiol.*, **13**, 236–242.
5. Kuroda, A. (2006) A polyphosphate-Lon protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 325–331.
6. Lonetti, A., Sziygarto, Z., Bosch, D., Loss, O., and Azevedo, C. (2011) Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases, *J. Biol. Chem.*, **286**, 31966–31974.
7. Wilson, M.S., Livermore, T.M., and Saiardi, A. (2013) Inositol pyrophosphates: between signalling and metabolism, *Biochem. J.*, **452**, 369–379.
8. Dedkova, E.N., and Blatter, L.A. (2014) Role of  $\beta$ -hydroxybutyrate, its polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate in mammalian health and disease, *Front. Physiol.*, **5**, 260, DOI: 10.3389/fphys.2014.00260.
9. Sethuraman, A., Rao, N.N., and Kornberg, A. (2001) The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8542–8547.
10. Эльдаров М.А., Баранов М.В., Думина М.В., Жгун А.А., Андреева Н.А., Трилисенко Л.В., Кулаковская Т.В., Рязанова Л.П., Кулаев И.С. (2013) Полифосфаты и экзополифосфатазная активность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при сверхэкспрессии гомо- и гетерологичных генов *PPN1*, *Биохимия*, **78**, 1201–1209.
11. Eckert-Boulet, N., Pedersen, M.L., Krogh, B.O., and Lisby, M. (2012) Optimization of ordered plasmid assembly by gap repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **29**, 323–334.
12. Rubin, G.M. (1973) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* 5.8 S ribosomal ribonucleic acid, *J. Biol. Chem.*, **11**, 3860–3875.
13. 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.

14. Bensandoun, A., and Weinstein, D. (1976) Assay of protein in the presence of interfering materials, *Anal. Biochem.*, **70**, 241–250.
15. 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.
16. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кулаев И.С. (2000) Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей, *Биохимия*, **65**, 414–420.
17. Heinonen, Y.K., and Lahti, R.Y. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic phosphate, *Anal. Biochem.*, **113**, 313–317.
18. Vagabov, V.M., Trilisenko, L.V., Kulakovskaya, T.V., and Kulaev, I.S. (2008) Effect of carbon source on polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, **8**, 877–882.
19. Wurst, H., Shiba, T., and Kornberg, A. (1995) The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **177**, 898–906.
20. Tammenkoski, M., Moiseev, V.M., Lahti, M., Ugochukwu, E., Brondijk, T.H., White, S.A., Lahti, R., and Baykov, A.A. (2007) Kinetic and mutational analyses of the major cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **282**, 9302–9311.
21. Личко Л.П., Эльдаров М.А., Думина М.В., Кулаковская Т.В. (2014) Сверхэкспрессия гена *PPX1* не влияет на полифосфаты на *Saccharomyces cerevisiae*, *Биохимия*, **79**, 1487–1492.
22. Личко Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (2010) Свойства частично очищенной эндополифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Биохимия*, **75**, 1596–1600.
23. 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.
24. Личко Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаковская Е.В., Кулаев И.С. (2008) Инактивация генов *PPX1* и *PPN1*, кодирующих экзополифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, не препятствует использованию полифосфатов в качестве фосфорных резервов, *Биохимия*, **73**, 1224–1229.

**POLYPHOSPHATE AND POLYPHOSPHATASE  
ACTIVITY IN THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae*  
UNDER OVEREXPRESSION OF THE *DDP1* GENE**

**L. V. Trilisenko<sup>1</sup>, N. A. Andreeva<sup>1</sup>, M. A. Eldarov<sup>2</sup>,  
M. V. Dumina<sup>2</sup>, T. V. Kulakovskaya<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,  
Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 5, Pushchino 142290,  
Moscow Region, Russia; fax: +7(495)956-3370,  
E-mail: alla@ibpm.pushchino.ru

<sup>2</sup> Center «Bioengineering», Russian Academy of Sciences,  
prosp. 60-letiya Oktyabrya 7, korp. 1, Moscow 117312, Russia

Received April 24, 2015  
Revision received May 20, 2015

The effects of overexpression of yeast diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase DDP1 having endopolyphosphatase activity on metabolism of inorganic polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae* were studied. The endopolyphosphatase activity in the transformant strain significantly increased compared to the parent strain. This activity was observed with polyphosphates of different chain lengths and was suppressed by 2 mM tripolyphosphate or ATP. The content of acid-soluble polyphosphates under DDP1 overexpression decreased slightly, while the content of other fractions decreased by 28%. The average chain length of salt-soluble and alkali-soluble fractions did not change in the overexpressing strain, and that of acid-soluble polyphosphate increased in a medium with phosphate excess. During the recovery of polyphosphate level after phosphorus starvation, the chain length of acid-soluble fraction in the cells of the transformant was lower compared to the recipient strain. This observation suggests complex nature of the participation of DDP1 in the regulation of the content and chain length of polyphosphate in yeasts.

**Key words:** polyphosphate, diphosphoinositol pentakisphosphate, bidiphosphoinositol tetrakisphosphate, polyphosphatase, *DDP1* gene, *Saccharomyces cerevisiae*