

УДК 579.253.4:579.222+579.258

НОКАУТ-МУТАЦИИ В ГЕНАХ, КОДИРУЮЩИХ ПЕРЕНОСЧИКИ ФОСФАТА, НАРУШАЮТ АДАПТАЦИЮ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* К ПОТРЕБЛЕНИЮ ЭТАНОЛА

© 2024 г. Л. А. Ледова^а, Л. П. Рязанова^а, Т. В. Кулаковская^{а, *}

^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, 142290, Пушкино, Россия
*e-mail: alla@ibpm.ru

Поступила в редакцию 01.03.2024 г.

После доработки 23.03.2024 г.

Принята к публикации 28.03.2024 г.

Переносчики фосфата в клетках дрожжей ответственны за гомеостаз фосфора, а также опосредованно вовлечены в регуляцию различных адаптивных процессов. Одним из таких процессов является адаптация клеток к потреблению этанола, которое требует значительных изменений в фосфорном обмене. В данной работе показано, что штаммы *Saccharomyces cerevisiae* с нокаут-мутациями в генах переносчиков фосфата *PHO87*, *PHO89*, *PHO90* и *PHO91* хуже приспособляются к потреблению этанола при его концентрации 4%. Это выражается как в удлинении лаг-фазы, так и в снижении скорости роста на активной стадии. Клетки мутантов отличаются по содержанию неорганических полифосфатов, но не ортофосфата, от родительского штамма: они содержат меньше длинноцепочечных полифосфатов. Этот эффект наблюдали при культивировании на этаноле, но не на глюкозе. При культивировании на среде, содержащей 4% этанол, штамм с нокаут-мутацией в гене *PHO84*, кодирующем переносчик фосфата и двухвалентных металлов, а также штаммы-нокауты по генам *PHM6* и *PHM7*, ответственным за сверхнакопление полифосфатов, не проявили особенностей роста на среде с 4% этанолом по сравнению с родительским штаммом. Обсуждается возможная роль переносчиков фосфата и неорганических полифосфатов в адаптации дрожжей к потреблению этанола.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, неорганические полифосфаты, переносчик фосфата, этанол, нокаут-мутация

DOI: 10.31857/S0026365624050085

Изучение адаптации клеток дрожжей к этанолу является важной задачей для оптимизации биотехнологий, связанных с виноделием (Эльдаров и соавт., 2016) и производством технического этанола (Розанов и соавт., 2014). Методами транскриптомного анализа установлено, что толерантность к этанолу включает взаимодействие многих генов и затрагивает практически все стороны метаболизма дрожжевых клеток (Ma, Liu, 2010; Stanley et al., 2010; Wolf et al., 2023). Среди генов, экспрессия которых возрастает при адаптации к этанолу, можно отметить гены, кодирующие белки клеточной оболочки, транспортные белки цитоплазматической мембраны, гены, обеспечивающие функционирование вакуолей, а также гены, продукты которых вовлечены в реакцию на осмотический, тепловой и окислительный стрессы (Ma, Liu, 2010; Stanley et al., 2010;

Wolf et al., 2023). Так, показано, что для толерантности дрожжей к этанолу необходимы гены, кодирующие белки теплового шока и факторы транскрипции Msn4p и Msn2p (Ma, Liu, 2010). Отмечается важность длинных некодирующих РНК (Long noncoding RNA, LncRNA), а также белков, участвующих в процессах автофагии (Wolf et al., 2023). Например, фактор транскрипции Rpn4 стимулирует экспрессию системы автофагии при этанольном стрессе посредством активации синтеза вакуолярной протеиназы PRB1 (Bubis et al., 2020). Несмотря на то, что вопросу о механизмах толерантности дрожжей к этанолу посвящено множество работ, в том числе и обзоров (Auesukaree, 2017; Sahana et al., 2024), вопрос о роли фосфорного обмена в адаптации к этанолу у дрожжей не находится в фокусе внимания исследователей. В то же время, фосфорный обмен претерпевает при росте

на этаноле значительные изменения. Так, содержание АТФ в клетках *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании на этаноле возрастает на 70% по сравнению с культивированием на глюкозе (Вагабов и соавт., 2011). Неорганические полифосфаты (полиР) являются у многих микроорганизмов одним из факторов адаптации к стрессам (Rao et al., 2009; Denoncourt et al., 2021; Andreeva et al., 2022). При росте *S. cerevisiae* на этаноле происходят значительные изменения в составе полиР: увеличивается содержание длинноцепочечных фракций и уменьшается содержание короткоцепочечных полимеров (Vagabov et al., 2008), резко снижается содержание полиР в митохондриях (Андреева и соавт., 2008). Такие изменения предполагают возможность вовлечения системы минерального фосфорного обмена в процессы, происходящие в клетках дрожжей при адаптации к этанолу. Среди белков, вовлеченных в гомеостаз фосфора у дрожжей, особый интерес представляют в данном случае транспортеры фосфата, поскольку адаптация к этанолу сопровождается значительными изменениями в цитоплазматической мембране и мембранах других органелл (Ma, Liu, 2010; Stanley et al., 2010).

Цитоплазматическая мембрана клеток дрожжей *S. cerevisiae* содержит несколько транспортеров фосфата, а вакуолярная мембрана – один транспортер Pho91 с разным сродством к фосфату и регуляторными свойствами (Eskez et al., 2018).

Целью работы было определить влияние нокаут-мутаций в генах, кодирующих переносчики фосфата, на рост и содержание неорганических полифосфатов у *S. cerevisiae* при культивировании в среде с 4% этанолом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали коммерческие штаммы из коллекции Dharmascon:

штамм ВУ4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) как родительский штамм (wt) и полученные на его основе штаммы-нокауты по генам, кодирующим переносчики фосфата (табл. 1).

Состав среды и условия культивирования. Культуры поддерживали на агаризованной среде YPD. Инокуляты выращивали на среде YPD (1% дрожжевой экстракт (“Sigma-Aldrich”, США), 2% пептон (“Pronadisa”, Испания) и 2% глюкоза) в колбах Эрленмейера с объемом среды 100 мл при 29°C в течение 24 ч на качалке со 145 об./мин. Для получения кривых роста культуры выращивали на среде YP (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон) с добавлением этанола в концентрациях, указанных в подписях к рисункам и таблицам. Объем среды составлял 50 мл, культивирование проводили при 250 об./мин и 29°C. Оптическую плотность культур измеряли на спектрофотометре (“Unico”, США) при 600 нм в кювете толщиной 3 мм. Для получения биомассы культивирование проводили как на среде YPD с глюкозой, так и на среде YP с 4% этанолом в указанных выше условиях.

Экстракция полифосфатов. Для экстракции полиР использовали образцы биомассы после культивирования на среде с глюкозой в течение 24 ч, а в среде с этанолом – в течение 60 ч. Клетки отделяли от среды центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин и дважды промывали дистиллированной водой при тех же условиях центрифугирования. Образцы по 150 мг сырой биомассы каждый замораживали, хранили при –20°C и использовали для анализа. Экстракцию ортофосфата (Pi), кислоторастворимой фракции полиР (полиР1) и кислотонерастворимой фракции полиР (полиР2) проводили при 0°C как описано ранее (Трилисенко и соавт., 2023). Содержание Pi до гидролиза и после гидролиза полифосфатов (Трилисенко и соавт., 2023) определяли колориметрическим методом с малахитовым зеленым (Andreeva et al., 2019) с помощью планшетного фотометра (ОАО “МЗ “Сапфир”, Россия).

Таблица 1. Транспортеры фосфата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* согласно базе данных SDG (<https://www.yeastgenome.org/>)

Систематическое обозначение гена (ID)	Название гена	Функции кодируемого белка
YML123C	<i>PHO84</i>	Высокоаффинный транспортер фосфата и низкоаффинный транспортер катионов двухвалентных металлов
YCR037C	<i>PHO87</i>	Низкоаффинный транспортер фосфата плазматической мембраны
YBR296C	<i>PHO89</i>	Na ⁺ /P _i симпортер плазматической мембраны
YJL198W	<i>PHO90</i>	Низкоаффинный транспортер фосфата плазматической мембраны
YNR013C	<i>PHO91</i>	Низкоаффинный транспортер фосфата вакуолярной мембраны, экспортирует фосфат из вакуоли в цитоплазму

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор концентрации этанола. Мы провели культивирование штамма ВУ4741 на средах с тремя различными концентрациями этанола (рис. 1). Показано, что уже при культивировании в среде с 4%-ым этанолом происходит увеличение длины лаг-фазы, а при культивировании в среде с 7%-ым этанолом не только увеличивается длина лаг-фазы, но и снижается скорость роста. Таким образом, для выбранного нами штамма дрожжей уже 4% этанола представляют собой стрессовые условия. Для дальнейших исследований мы выбрали эту промежуточную концентрацию.

Влияние нокаут-мутаций по генам переносчиков фосфата. Мы провели культивирование на этаноле нокаут-мутантов в генах переносчиков фосфата (Eskez et al., 2018), а также в двух генах РНО-пути, *PHM6* и *PHM7*, участвующих в накоплении полиР (Kulakovskaya et al., 2023) в среде с 4% этанолом. Кривые роста штаммов *Δrho84*, *Δrho6* и *Δrho7* не отличались от кривых роста родительского штамма ВУ4741 (не иллюстрируется). Остальные мутантные штаммы демонстрировали либо увеличение продолжительности лаг-фазы, либо уменьшение оптической плотности культуры при выходе на стационарную стадию роста (рис. 2).

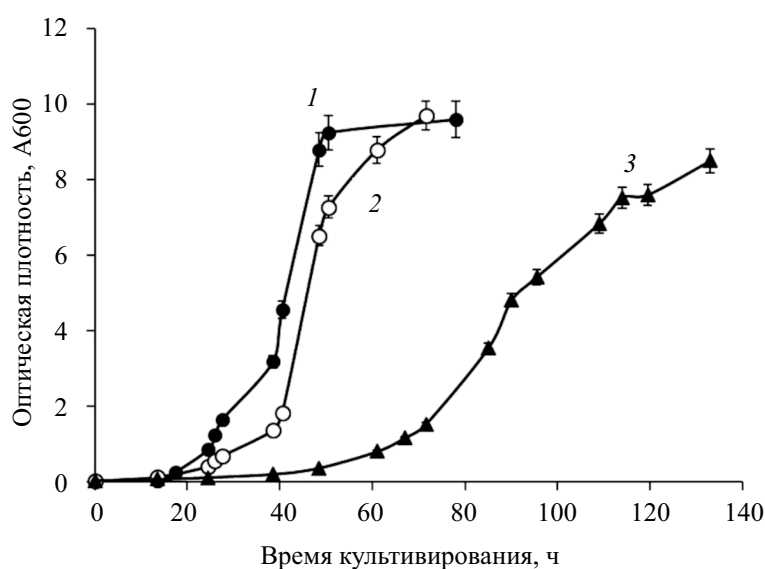


Рис. 1. Рост штамма ВУ4741 (wt) на средах УР с 1% этанолом (1), 4% этанолом (2) и 7% этанолом (3).

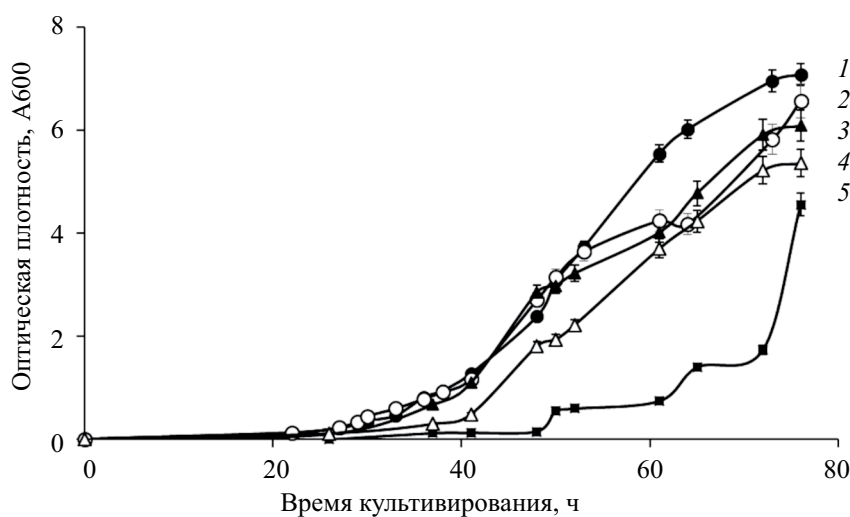


Рис. 2. Рост штамма ВУ4741 (wt) и штаммов-нокаут мутантов по генам переносчиков фосфата на среде УР с 4% этанолом: 1 – wt; 2 – *Δrho87*; 3 – *Δrho90*; 4 – *Δrho91*; 5 – *Δrho89*.

Таблица 2. Содержание кислоторастворимых полиР (полиР1) и кислотонерастворимых полиР (полиР2) в клетках родительского и мутантных штаммов *S. cerevisiae*; мкмоль Р/г сырой биомассы. Культивирование проводили в течение 24 ч на среде YPD с 2% глюкозой и в течение 60 ч на среде YP с 4% этанола. Статистическую значимость оценивали относительно данных для штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: ** – $p < 0.01$; * – $p < 0.1$; во всех остальных случаях разница статистически незначима

Штамм	Среда с 2% глюкозой		Среда с 4% этанола	
	ПолиР1	ПолиР2	ПолиР1	ПолиР2
WT	48.4 ± 7.2	45.6 ± 7.84	7.73 ± 4.0	53.4 ± 11.6
<i>Δrho87</i>	41.2 ± 9.95	36.3 ± 8.06	12.8 ± 3.85	13.9 ± 2.18 **
<i>Δrho89</i>	51.4 ± 7.01	37.3 ± 0.496	15.9 ± 4.67 *	39.5 ± 7.6
<i>Δrho90</i>	37.9 ± 2.41	38.3 ± 10.3	25.3 ± 4.9 **	36.6 ± 4.72
<i>Δrho91</i>	48.1 ± 1.72	46.7 ± 5.16	32.6 ± 4.8 **	30.1 ± 3.44 *

Полученные данные свидетельствуют о важном значении систем транспорта фосфата для адаптации к этанолу. Отметим, что при культивировании на глюкозе никакой разницы в характере кривых роста между исследуемыми штаммами найдено не было (не иллюстрируется).

Содержание полифосфатов в клетках мутантов по генам переносчиков фосфата. Для анализа содержания полиР мы выбрали, кроме штамма wt, также мутанты *Δrho87*, *Δrho89*, *Δrho90* и *Δrho91*, поскольку у этих штаммов наблюдали изменения кривых роста. В табл. 2 показано содержание кислоторастворимых полиР1 (относительно короткоцепочечных) и кислотонерастворимых полиР2 (относительно длинноцепочечных) в клетках родительского и мутантных штаммов при культивировании в среде с глюкозой в течение 24 ч или в среде с 4% этанолом в течение 60 ч.

Содержание ортофосфата в клетках всех штаммов при культивировании на глюкозе не имело статистически достоверных различий и составляло

34–39 и 20–25 мкмоль Р/г сырой биомассы при росте в средах с глюкозой и этанолом соответственно. При росте на глюкозе некоторые мутантные штаммы имели сниженное содержание полиР, однако это снижение не было значительным (табл. 2). При культивировании на этаноле, с одной стороны, произошли значительные изменения в содержании полиР у штамма wt (табл. 2), а с другой стороны, выявились различия между штаммами. Суммарное содержание полиР снизилось у всех штаммов в неодинаковой степени. Характерным изменением в содержании полиР при росте на этаноле является снижение содержания короткоцепочечных полиР1 и увеличение содержания длинноцепочечных полиР2 (Vagabov et al., 2008). Такое изменение в содержании полиР наблюдали только у штамма wt (табл. 2). У мутантных штаммов содержание полиР2 либо не увеличивалось, либо даже резко уменьшалось, как у штамма *Δrho87*. Снижение содержания полиР1 ни у одного из мутантных штаммов не достигало уровня, характерного для штамма wt. По-видимому, нарушение транспорта

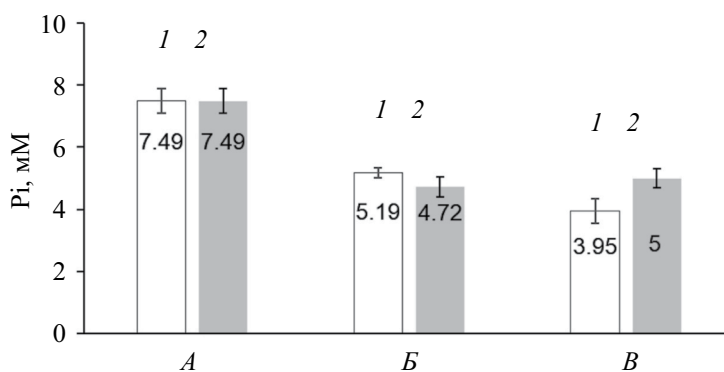


Рис. 3. Концентрация фосфата в среде до культивирования (А) и после культивирования штаммов *S. cerevisiae* в среде YPD с 2% глюкозой (Б) и YP с 4% этанолом (В): 1 – штамм wt; 2 – штамм *Δrho87*. Статистическую значимость оценивали относительно данных для штамма wt с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: В – $p < 0.01$; А и Б – разница статистически незначима.

фосфата через цитоплазматическую и вакуолярную мембрану вызывает изменения в содержании полиР разной длины цепи в условиях спиртового стресса. Кроме того, судя по снижению содержания полиР, эти полимеры с высокой энергией фосфоэфирной связи расходуется клетками на поддержание жизнеспособности на ранних стадиях роста, когда системы защиты от повышенной концентрации этанола еще не сформированы. В наибольшей степени снижено содержание полиР у штамма *Δrho87* (табл. 2). Отметим, что среда культивирования содержала свыше 7 мМ фосфата, что не является лимитирующей концентрацией. Мы проверили, как меняется концентрация фосфата к стационарной стадии роста на средах с глюкозой и этанолом для штамма wt и штамма *Δrho87*, поскольку этот мутант в наибольшей степени утратил свои полиР. Эти изменения позволяют оценить общую способность клеток дрожжей к поглощению фосфата из среды. Оказалось, что при культивировании в среде с глюкозой способность к поглощению фосфата не различалась у этих двух штаммов (рис. 3).

При культивировании в среде с 4% этанолом способность к поглощению фосфата у штамма *Δrho87* была снижена по сравнению со штаммом wt (рис. 3). Это объясняет низкий уровень полиР при культивировании мутантного штамма в среде с 4% этанолом. В литературе имеются сведения о сложных путях настройки активности переносчиков фосфата у дрожжей, когда происходит интеграция нескольких механизмов передачи сигналов, чтобы приспособить системы гомеостаза фосфора к общему статусу окружающей среды (Ghillebert et al., 2011; Eskes et al., 2018).

В совокупности наши результаты показывают, что переносчики фосфата Pho87, Pho89, Pho90 и Pho91 вовлечены в адаптационные процессы, позволяющие клеткам дрожжей преодолевать стресс, вызванный повышенной концентрацией этанола.

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

Андреева Н.А., Кулаковская Т.В., Кулаковская Е.В., Кулаев И.С. Полифосфаты и экзополифосфатазы

в цитозоле и митохондриях *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании на глюкозе и этаноле в условиях гиперкомпенсации по фосфату // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 80–85.

Andreeva N.A., Kulakovskaya T.V., Kulakovskaya E.V., Kulaev I.S. Polyphosphates and exopolyphosphatases in cytosol and mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose or ethanol under phosphate surplus // Biochemistry (Moscow). 2008. V. 73. P. 65–69.

Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кочеткова О.Ю., Ильченко А.П., Кулаев И.С. Влияние *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразона на синтез неорганических полифосфатов *Saccharomyces cerevisiae* в разных условиях роста // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 18–23.

Vagabov V.M., Trilisenko L.V., Kochetkova O.Y., Ilchenko A.P., Kulaev I.S. Effect of *m*-carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone on inorganic polyphosphates synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under different growth conditions // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 15–20.

Розанов А.С., Котенко А.В., Акбердин И.Р., Пельтек С.Е. Рекомбинантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* для получения этанола из растительной биомассы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. С. 989–998.

Трилисенко Л.В., Валиахметов А.Я., Кулаковская Т.В. Физиологические особенности *Saccharomyces cerevisiae* при сверхэкспрессии полифосфатазы Ppx1 // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 396–403.

Trilisenko L.V., Valiakmetov A.Ya., Kulakovskaya T.V. Physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strain overexpressing polyphosphatase Ppx1 // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 545–551.

Эльдаров М.А., Кишкова С.А., Танащук Т.Н., Марданов А.В. Геномика и биохимия винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Успехи биологической химии. 2016. Т. 56. С. 155–196.

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.

Andreeva N., Ryazanova L., Ledova L., Trilisenko L., Kulakovskaya T. Stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing yeast polyphosphatases // Stresses. 2022. V. 2. P. 17–25.

Auesukaree C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation // J. Biosci. Bioeng. 2017. V. 124. P. 133–142.

Bubis J.A., Spasskaya D.S., Gorshkov V.A., Kjeldsen F., Kofanova A.M., Lekanov D.S., Gorshkov M.V., Karpov V.L., Tarasova I.A., Karpov D.S. Rpn4 and proteasome-mediated yeast resistance to ethanol includes regulation of autophagy // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 4027–4041.

- Denoncourt A., Downey M. Model systems for studying polyphosphate biology: a focus on microorganisms // *Curr. Genet.* 2021. V. 67. P. 331–346.
- Eskes E., Deprez M.A., Wilms T., Winderickx J. pH homeostasis in yeast; the phosphate perspective // *Curr. Genet.* 2018. V. 64. P. 155–161.
- Ghillebert R., Swinnen E., De Snijder P., Smets B., Winderickx J. Differential roles for the low-affinity phosphate transporters Pho87 and Pho90 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. J.* 2011. V. 434. P. 243–251.
- Kulakovskaya E., Zvonarev A., Kulakovskaya T. *PHM6* and *PHM7* genes are essential for phosphate surplus in the cells of *Saccharomyces cerevisiae* // *Arch. Microbiol.* 2023. V. 205. Art. 47.
- Ma M., Liu Z.L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 87. P. 829–845.
- Rao N.N., Gómez-García M.R., Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. V. 78. P. 605–647.
- Sahana G.R., Balasubramanian B., Joseph K.S., Pappuswamy M., Liu W.-C., Meyyazhagan A., Kamyab H., Chelliapan S., Biljo V.J. A review on ethanol tolerance mechanisms in yeast: current knowledge in biotechnological applications and future directions // *Process Biochemistry.* 2024. V. 138. P. 1–13.
- Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J., Stanley G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Appl. Microbiol.* 2010. V. 109. P. 13–24.
- Vagabov V.M., Trilisenko L.V., Kulakovskaya T.V., Kulaev I.S. Effect of a carbon source on polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2008. V. 8. P. 877–882.
- Wolf I.R., Marques L.F., de Almeida L.F., Lázari L.C., de Moraes L.N., Cardoso L.H., Alves C.C.d.O., Nakajima R.T., Schnepfer A.P., Golim M.d.A., et al. Integrative analysis of the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. Art. 5646.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Knockout Mutations in the Genes Encoding Phosphate Transporters Impair Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Consumption

L. A. Ledova¹, L. P. Ryzanova¹, and 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, Pushchino, 142290, Russia

*e-mail: alla@ibpm.ru

Abstract. Phosphate transporters in yeast cells are responsible for phosphorus homeostasis, and also indirectly involved in the regulation of various adaptive processes. One of these processes is the adaptation to ethanol consumption, which requires significant changes in phosphorus metabolism. We demonstrated that knockout mutations in the genes encoding phosphate transporters *PHO87*, *PHO89*, *PHO90* and *PHO91* impair adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol consumption at ethanol concentration of 4%. For these mutant strains an extension of the lag phase and in a decrease in the growth rate at the active stage was observed when the cells were cultivated in the medium with 4% ethanol. Mutant cells differ in the content of inorganic polyphosphates, but not orthophosphate, from the parental strain: they contain less long-chain polyphosphates when cultivated on ethanol, but not on glucose. When cultivated on a medium containing 4% ethanol, a strain with a knockout mutation in the *PHO84* gene, encoding the transporter of phosphate and divalent metals, as well as knockout strains for the *PHM6* and *PHM7* genes, responsible for the polyphosphate overplus, did not show any growth differences compared with parent strain in a medium with 4% ethanol. The possible role of phosphate transporters and inorganic polyphosphates in the adaptation of yeast to ethanol consumption is discussed.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, inorganic polyphosphate, phosphate transporter, ethanol, knockout mutation