

*Посвящается И. С. Кулаеву,  
пионеру биохимии полифосфатов,  
в связи с 90-летием со дня рождения*

## **ФЕРМЕНТЫ МЕТАБОЛИЗМА ПОЛИФОСФАТОВ У ДРОЖЖЕЙ: СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ, ЛОКАЛИЗАЦИЯ, ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

©2021 г. Т. В. КУЛАКОВСКАЯ<sup>1</sup>, Н. А. АНДРЕЕВА<sup>1</sup>,  
Л. А. ЛЕДОВА<sup>1</sup>, Л. П. РЯЗАНОВА<sup>1</sup>,  
Л. В. ТРИЛИСЕНКО<sup>1</sup>, **М. А. ЭЛЬДАРОВ**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуцино, Московская обл.*

<sup>2</sup> *Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва*

I. Введение. II. VTC комплекс – полифосфат синтаза дрожжей.  
III. Полифосфатазы дрожжей. IV. Практическое значение поли-  
фосфатаз. V. Заключение.

### **I. ВВЕДЕНИЕ**

Неорганические полифосфаты (полиР), линейные полимеры ортофосфорной кислоты, занимают на первый взгляд довольно скромное и обособленное место среди биологически значимых полимеров. Относительно недавно их считали микробными запасниками фосфора, «молекулярным ископаемым», присутствующим в клетках отдельных видов микроорганизмов. Академик А. Н. Белозерский, один из основателей молекулярной биологии в нашей стране, заинтересовался этими богатыми энергией молекулами еще в середине прошлого века. Он полагал, что полиР на начальных этапах возникновения жизни на Земле образовывались абиогенно и предшествовали АТФ, основному энергетическому соединению живых организмов. Игорь Степанович Кулаев был учеником А. Н. Белозерского, и их пионерские работы в

---

*Принятые сокращения:* полиР – неорганические полифосфаты.

*Адрес для корреспонденции:* [alla@ibpm.pushchino.ru](mailto:alla@ibpm.pushchino.ru)

области биохимии полиР доказали, что эти минеральные фосфорные соединения вовлечены в центральный метаболизм микроорганизмов [1–3].

В дальнейшем член-корреспондент РАН И. С. Кулаев стал одним из ведущих ученых в области биохимии полифосфатов, а его монография [4, 5] – базовым руководством по свойствам и функциям этих полимеров. Его идея о том, что высокомолекулярные полифосфаты являются регуляторами метаболических процессов, в настоящее время получила всеобщее признание. Получены многочисленные доказательства того, что они являются универсальными регуляторными соединениями и участвуют в контроле экспрессии генов, адаптации к стрессам, мембранном транспорте и обеспечении клеточной подвижности [6, 7]. Способность полиР участвовать в самых разных клеточных процессах определяется их физико-химическими свойствами.

Эти макроэргические отрицательно заряженные полимеры способны непосредственно и опосредованно в присутствии катионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  связываться с белками, полигидроксibuтиратом и полисахаридами, изменяя их биологическую активность.

В настоящее время сложилась концепция об участии полиР и ферментов полифосфатного метаболизма в разнообразных процессах регуляции жизнедеятельности эукариот. Получены убедительные данные о ключевой роли полиР в росте и развитии костной ткани [8, 9], которая состоит в следующем. В остеокластах накапливаются кальций и полиР в виде специфических гранул, которые в результате экзоцитоза выходят во внеклеточное пространство в местах роста или репарации кости. Здесь гранулы разрушаются, щелочная фосфатаза гидролизует полифосфаты до ортофосфата. При участии специфических белков из высвобождающихся ортофосфата и кальция формируется структурированный апатит кости. Литература по этому вопросу насчитывает свыше двухсот ссылок за последние десять лет. Гранулы, содержащие полифосфаты, найдены в тромбоцитах [10]. При разрушении тромбоцитов полиР выходят в кровь, где участвуют в каскаде свертывания, связываясь с фактором XII и активируя его, а затем эти полимеры и ионы кальция входят в состав тромба, увеличивая его стабильность [11, 12]. ПолиР крови являются участниками воспалительного ответа [12]. Обнаружено участие полиР в передаче сигналов в нервных клетках [13, 14]. Они являются медиаторами сигналов между астроцитами посредством активации пуринергических рецепторов. ПолиР участвуют в образовании фибрилл амилоидогенных белков, причем в нецитотоксической форме, предотвращая формирование амилоидов, нарушающих интактность

клеток [15]. ПолиР входят в состав специфического кальциевого канала мембран митохондрий, регулирующего уровень кальция и стрессовый ответ в этих органеллах [16, 17].

Таким образом, знания о метаболизме полиР эукариот являются необходимым звеном для формирования представлений о нарушениях минерального фосфорного обмена у человека и разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, костной ткани, нервной системы. Уже сегодня разрабатываются новые материалы для лечения заболеваний и травм кости, в том числе наночастицы и костные импланты, содержащие полиР для стимуляции образования апатита [18–20], а также ингибиторы тромбообразования – антагонисты полиР [21].

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, классический модельный эукариотический организм, проявляют сходство с клетками млекопитающих с точки зрения минерального фосфорного обмена. Так, в условиях катаболитной репрессии глюкозой у дрожжей происходит биоминерализация митохондрий за счет накопления неорганических полифосфатов [22]. По-видимому, аналогичный процесс лежит в основе формирования фосфорно-кальциевых гранул, содержащих полифосфаты и кальций, в тромбоцитах и остеобластах. У белка полифосфатазы дрожжей Ppx1 найден ортологичный белок, кодируемый геном *rgne* в геноме человека [23].

Клетки *S. cerevisiae* имеют многокомпонентную систему метаболизма полиР, включающую Vtc комплекс, состоящий из пяти белков и ответственный за биосинтез полиР, а также полифосфатазы Ppx1, Ppn1, Ddp1, и Ppn2, участвующие в деградации полиР. Целью данного обзора является сравнительный анализ данных о физико-химических свойствах и функциях этих ферментов.

## II. VTC КОМПЛЕКС – ПОЛИФОСФАТ СИНТАЗА ДРОЖЖЕЙ

В клетках большинства бактерий за синтез полиР ответственны полифосфаткиназы, ферменты, катализирующие перенос фосфатного остатка с АТФ на растущую цепь полиР и обратную реакцию [6]. Гены, кодирующие полифосфаткиназы, обнаружены только у нескольких видов эукариот и их присутствие объясняют горизонтальным переносом от бактерий [24–26]. У дрожжей реакция переноса терминального фосфатного остатка с АТФ на полиР была обнаружена в вакуолярной мембране достаточно давно [27], однако фермент, осуществляющий эту реакцию, долгое время не удавалось

идентифицировать. Затем было установлено, что у *S. cerevisiae* [28] и *Ustilago maydis* [29] нокаут-мутанты по гену *VTC4* содержат очень мало полиР по сравнению с родительскими штаммами. Белок Vtc4 является частью VTC комплекса вакуолярной мембраны дрожжей, в состав которого также входят белки Vtc1, Vtc2 и Vtc3 [30, 31]. Этот комплекс локализован в вакуолярной мембране, и к числу его функций относится функция шаперона по отношению к V-АТФазе этой мембраны и участие в слиянии вакуолярной мембраны с другими мембранными структурами [30, 31].

Доказательства наличия у Vtc4 полифосфат синтазной активности и ее детальная характеристика даны в работе Hothorn и соавторов [32]. С помощью рентгеновской кристаллографии установлено, что фрагмент этого белка Vtc4p<sup>189-480</sup> содержит длинный электронноплотный домен, ответственный за образование полиР из АТФ [32]. Этот фрагмент способен катализировать синтез полиР из АТФ в растворе в присутствии Mn<sup>2+</sup>. Фермент также способен использовать другие нуклеозид трифосфаты и dАТФ, имеет умеренную специфичность в отношении двухвалентных катионов: Mn<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Co<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup> > Fe<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup>. Праймерами полиР синтазной реакции могут служить как ортофосфат, так и пирофосфат, причем пирофосфат более эффективен. Каталитический домен обращен в цитоплазму, что предполагает транспорт полиР через вакуолярную мембрану. Точечные мутации в гене, кодирующем Vtc1 снижают уровень полиР в клетке [32]. Предположено, что этот белок принимает участие в транспорте полиР через вакуолярную мембрану [32].

VTC комплекс в клетках дрожжей присутствует в двух формах Vtc4/Vtc3/Vtc1 и Vtc4/Vtc2/Vtc1 [33]. Первая форма характерна для вакуолярной мембраны, а вторая – для мембраны эндоплазматического ретикулума и оболочки ядра, но появляется в вакуолярной мембране при фосфорном голодании [33]. Считается, что Vtc2 и Vtc3, не показывающие никакой активности *in vitro*, выполняют регуляторную функцию. Эти белки наряду с Vtc4 содержат SPX домены, которые обеспечивают связь с инозитолфосфатами, сигнальными молекулами, концентрация которых изменяется в зависимости от доступности фосфата [34]. Замены аминокислотных остатков в этом домене нарушающие связывание с инозитолфосфатами *in vitro*, приводят к снижению синтеза полиР у дрожжей [34]. Активатором полиР синтазы является 5-PP-InsP<sub>5</sub> [35]. Поиск SPX доменов у других белков привел к обнаружению еще одного компонента VTC комплекса – Vtc5 субъединицы [36]. Этот белок физически взаимодействует с VTC, делеция в соответствующем гене приводит к

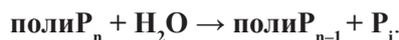
снижению уровня синтеза полиР, а сверхэкспрессия – к увеличению этого уровня. Vtc5, подобно другим белкам, входящим в состав VTC, является трансмембранным белком, у которого С-конец экспонирован в вакуолярный люмен, а N-конец – в цитоплазму [36]. Отметим, что мутанты по гену *VTC4* содержат небольшое, но достоверно определяемое количество полиР [28]. Это предполагает наличие других ферментных систем, способных к синтезу полиР. Среди возможных претендентов на такой альтернативный синтез отметим долихил-дифосфат:полифосфат фосфотрансферазу (КФ 2.7.4.20), обнаруженную в мембранной фракции, полученной из клеток *S. cerevisiae* [37] и 1, 3 –дифосфоглицерат-полифосфат фосфотрансферазу (КФ 2.7.4.17), обнаруженную в бесклеточном экстракте *Neurospora crassa* [38]. Гены, кодирующие белки, ответственные за эти энзиматические реакции на данный момент не идентифицированы.

Итак, VTC у дрожжей играет основную роль в синтезе полиР, имеет множественную локализацию в клетке и регулируется инозитолфосфатом 5-PP-InsP<sub>5</sub>.

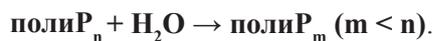
### III. ПОЛИФОСФАТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ

#### СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛИФОСФАТАЗ ДРОЖЖЕЙ

Гидролиз полиР у дрожжей катализируют ферменты, обладающие экзополифосфатазной и/или эндополифосфатазной активностью. Экзополифосфатаза (полифосфат фосфогидролаза, КФ 3.6.1.11) отщепляет ортофосфат с конца цепи полиР:



Эндополифосфатаза (полифосфат деполимераза, КФ 3.6.1.10.) расщепляет длинные цепи полиР на более короткие:



У *S. cerevisiae* идентифицированы гены четырех полифосфатаз, ферменты очищены и детально охарактеризованы [39–45]. В деградации полиР по-видимому также участвует щелочная фосфатаза Pho8, локализованная в вакуолях, поскольку нокаут-мутант по гену *PHO8* содержит больше полиР, чем родительский штамм [46].

Полифосфатазы дрожжей принадлежат к различным семействам белков (табл. 1). Ген *PPX1* не имеет интронов, о посттрансляционных модификациях этого белка не сообщалось. Полифосфатаза Ppx1 принадлежит к семейству фосфоэстераз ДНН, к которому также относятся неорганические пирофосфатазы семейства 2 грамм-поло-

Таблица 1. Полифосфатазы *Saccharomyces cerevisiae*  
(данные взяты из базы данных SDG – <https://www.yeastgenome.org/>)

Ген	Активность фермента	Структура фермента	Принадлежность к семейству белков
<i>PPX1</i>	Экзополифосфатаза	Одна субъединица, 45,05 кД	Семейство ДНН фосфоэстераз
<i>PPN1</i>	Экзо/эндополифосфатаза	<i>PPN1</i> кодирует полипептид с расчетной молекулярной 78,344 кД, зрелый белок – гомотетрамер состоящий из субъединиц 33–35 кД	Семейство PPN1
<i>PPN2</i>	Эндополифосфатаза	Одна субъединица 37,15 кД	PPP-суперсемейство металлофосфатаз
<i>DDP1</i>	Диаденозин – и дифосфоинозитол полифосфат фосфогидролаза, эндополифосфатаза	Одна субъединица 21,57 кД	Семейство Nudix гидролаз

жительных бактерий, белок ррпне насекомых и млекопитающих, и экзонуклеаза одноцепочечной ДНК RecJ [47]. Рентгеновская кристаллография Ppx1 выявила высокое сходство структуры активного центра с другими белками, принадлежащими к семейству 2 неорганических пирофосфатаз [47]. В структуре молекулы имеется большой протяженный канал, образованный положительно заряженными аминокислотами и обеспечивающий место связывания с полиР, и сайт гидролиза. Считается, что именно эта особенность структуры объясняет процессивный характер гидролиза и отсутствие активности с пирофосфатом [47]. Близкими ортологами для Ppx1 являются ррпне белки высших эукариот, которые имеют структурное сходство с Ppx1 *S. cerevisiae* до 25–30% [23]. Человеческий ррпне (h-ррпне) гидролизует короткоцепочечные полиР, хотя лучшими субстратами являются триполифосфат, тетраполифосфат и нуклеозид-5'-тетрафосфаты [23]. Продукт гена *PPN1* нуждается в специфическом протеолизе для созревания и проявления активности [41]. Белок Ppn1 содержит несколько предполагаемых сайтов гликозилирования и убиквитирования, причем N-гликозилирование необходимо для протеолиза [48]. При очистке Ppn1 часто образует большие агрегаты с молекулярной массой свыше 800 кД, а для стабилизации в виде гомотетрамера необходимы полиР [49].

Ортологами Ppn1 у высших эукариот являются сфингомиелин- и кальцийневрин-подобные фосфоэстеразы, однако степень сходства не превышает 15–20% [50].

У человека имеется три фермента, гидролизующих инозитол пирофосфат и деаденозин гексафосфат, DIPP1, DIPP2, и DIPP3a/b, сходные по последовательности с дрожжевым ферментом Ddp1 [43]. Подобно Ddp1, они способны расщеплять длинноцепочечные полиР на более короткие фрагменты, хотя и с более низкой активностью, чем фермент дрожжей [43]. Наиболее близким ортологом Ppn2 является диаденозин тетрафосфат гидролаза *Shigella flexneri 2a* [44]. Для других полифосфатаз прокариотические ортологи не выявлены. Значительные структурные различия между дрожжевыми полифосфатазами предполагают их разное эволюционное происхождение.

#### СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ, КИНЕТИКА, ИНГИБИТОРЫ И АКТИВАТОРЫ

Четыре известных полифосфатазы *S. cerevisiae* различаются по механизму гидролиза полиР: Ppx1 является экзополифосфатазой, Ppn1 проявляется как экзо- так и эндополифосфатазную активность в зависимости от двухвалентных катионов, Ppn2 и Ddp1 являются преимущественно эндополифосфатазами. На рис. 1 показаны электрофореграммы полиР, обработанных очищенными препаратами этих полифосфатаз [45]. При обработке Ppx1 длина цепи полиР не изменялась, что указывает на отсутствие эндополифосфатазной активности и согласуется с процессивным механизмом гидролиза субстрата. При обработке остальными тремя ферментами длина цепи полиР уменьшается, что указывает на наличие эндополифосфатазной активности. Экзополифосфатазные активности существенно различаются для очищенных препаратов ферментов в зависимости от метода очистки и условий анализа. Максимальные экзополифосфатазные активности с полиР имеющим среднюю длину цепи около 200 фосфатных остатков, составляли 300 Е/мг белка для Ppx1 [51] и 900 Е/мг белка для Ppn1 [52]. Экзополифосфатазные активности Ddp1 и Ppn2 были на три порядка ниже (0,05 and 0,1 Е/мг белка, соответственно [45] и в связи с этим, вероятно, не имеют существенного значения для метаболизма полиР. Оптимумы рН для дрожжевых полифосфатаз близки к 7,0 [39–45].

Все четыре полифосфатазы нуждаются в двухвалентных катионах металлов для проявления активности, однако неактивны с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  [39–45]. Зависимости эндо- и экзополифосфатазных активностей от вида и концентрации ионов металлов специфичны для каждого из этих ферментов (рис. 1 и рис. 2).

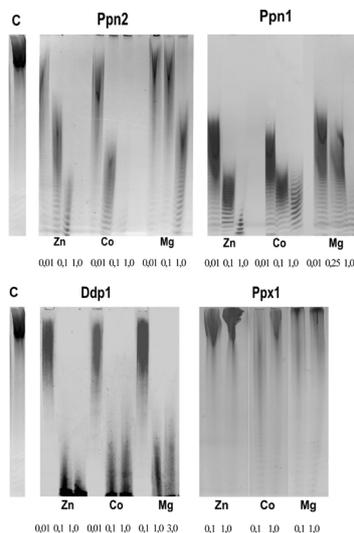


Рис. 1. Эндополифосфатазные активности полифосфатаз *S. cerevisiae* с полиР<sub>188</sub> в зависимости от концентрации двухвалентных катионов.

Представлены электрофореграммы полиР<sub>188</sub> после обработки препаратами очищенных полифосфатаз, полученных из штаммов-сверхпродуцентов [45]. С – контроль, полиР<sub>188</sub> инкубировали без добавления препаратов ферментов.

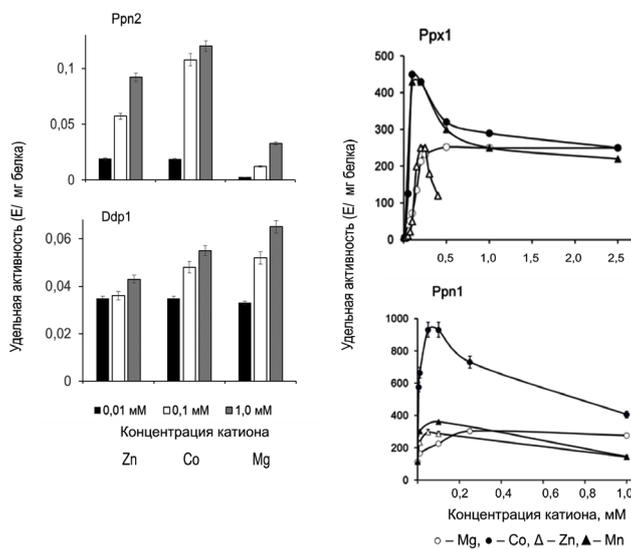


Рис. 2. Экзопполифосфатазные активности полифосфатаз *S. cerevisiae* с полиР<sub>188</sub> в зависимости от концентрации двухвалентных катионов [45, 50].

Таблица 2. Удельные активности экзополифосфатаз (% от активности с полиР<sub>208</sub>) и кажущиеся  $K_m$  при гидролизе различных субстратов ферментами *S. cerevisiae* Ppx1 и Ppn1 (Данные суммированы из работ [39, 42, 45, 49, 54, 55])

Субстрат	Ppx1 в присутствии 2,5 мМ Mg <sup>2+</sup>		Ppn1 в присутствии 0,1 мМ Co <sup>2+</sup>	
	Удельная активность, %	$K_m$ , мМ	Удельная активность, %	$K_m$ , мМ
полиР <sub>3</sub>	160	0,17–0,30	14	1,1
полиР <sub>9</sub>	113	0,015–0,019	45	
полиР <sub>15</sub>	118	0,011	88	0,075
полиР <sub>25</sub>	105		100	
полиР <sub>45</sub>	109		100	
полиР <sub>208</sub>	100	0,0009–0,0012	100	0,0035
пирофосфат	0		6	
dATP	0		15	0,88
ATP	0		7	
GTP	18		40	
Гуанозин-5'-тетра- фосфат	80–150	0,08	80	
Аденозин-5'-тетра- фосфат	80–150	0,08		

Моновалентные катионы стимулируют экзополифосфатазные активности Ppx1 и Ppn1, при этом ионы NH<sub>4</sub><sup>+</sup> более эффективны по сравнению с ионами K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup> [39, 42], ионы NH<sub>4</sub><sup>+</sup> также стимулировали и эндополифосфатазную активность Ppn1 и Ppn2 [45].

Эндополифосфатазные активности Ddp1 [43], Ppn1 и Ppn2 [52, 53] проявляются с полиР разной степени полимерности, со средней длиной цепи от 15 до 208 фосфатных остатков. Поскольку способ определения этой активности основан на наблюдении за уменьшением длины цепи полиР с помощью электрофореза, количественная оценка уровня активности в зависимости от длины цепи полиР в данном случае затруднена. Что касается экзополифосфатазной активности, что Ppn1 имеет более высокую активность с длинноцепочечными полиР, а Ppx1 – с триполифосфатом (табл. 2). Полифосфатазы дрожжей гидролизуют также некоторые органические соединения с фосфоэфирной связью, в том числе и вторичные сигнальные соединения. Напомним, что Ddp1 гидролизует диаденозин полифосфаты и ино-

зитол пирофосфаты, которые, вероятнее всего являются основными субстратами этого фермента *in vivo* [43]. Ppx1 отщепляет терминальный фосфат от аденозин-5'-тетрафосфата и гуанозин-5'-тетрафосфата [54, 55], но не способна к гидролизу инозитол пирофосфата [43]. Ppx1 и Ppn1 проявляют активность с разными нуклеозид фосфатами, в таблице 2 показано соотношение этих активностей для оптимальных условий определения, различных для этих ферментов. Ppx1 проявляет небольшую фосфодиэстеразную активность с цАМР [45] подобно ортологичному белку h-prune [23], а Ppn1 не обладает такой активностью. Ppx1 и Ppn1 не активны с *p*-нитрофенилфосфатом, глюкозо-6-фосфатом и глицерол-3-фосфатом, активность с пирофосфатом либо не проявляется, либо в некоторых условиях (в присутствии ионов  $Co^{2+}$ ) не превышает 7–10% величины активности с полиР<sub>188</sub> [39, 42, 45].

Недавно открыт новый способ пост-трансляционной модификации белков, приводящий к изменению их свойств и активности – ковалентное присоединение полиР к остаткам лизина, так называемое лизин-полифосфорилирование [56, 57]. Показано, что все четыре полифосфатазы способны гидролизовать эти полиР [56], причем наиболее активной является Ppn1 [57]. Вклад отдельных полифосфатаз в гидролиз полиР лизин-полифосфорилированных белков в клетке зависит от локализации этих ферментов и белков-мишеней [57].

Кинетика гидролиза полиР ферментом Ppx1 соответствует уравнению Михаэлиса-Ментен только в специальных условиях, при постоянной концентрации ионов магния [39, 51], а кинетика гидролиза полиР Ppn1 не согласуется с этим уравнением [42]. Для сравнительной оценки сродства этих полифосфатаз к субстратам мы приводим в табл. 2 так называемые  $K_m$  кажущиеся, которые соответствуют концентрациям субстратов, позволяющим достигнуть скорости реакции, равной половине от максимальной наблюдаемой скорости [32, 39, 45, 49]. Сродство к субстрату выше для длинноцепочечных полиР для обоих ферментов. Более детально кинетические параметры Ppx1 рассмотрены в работах [58, 59], где предполагается наличие дополнительного центра связывания ионов магния в молекуле фермента. Наличие такого центра по-видимому объясняет необычный стимулирующий эффект ЭДТА на активность Ppx1: в присутствии 1 мМ этого комплексона и 2,5 мМ ионов магния эта активность возросла в 1,5 раза [39, 51]. Подобный эффект отсутствует у Ppn1 [49].

Известным ингибитором полифосфатаз является гепарин [49, 51]. Наиболее чувствительная к этому конкурентному ингибитору полифосфатаза Ppn1, а полифосфатазы Ppn2 и Ddp1 характеризуются наименьшей чувствительностью. Эндополифосфатазная активность

Ppn1 полностью подавлялась гепарином в концентрации 0,01 мг/мл, тогда как эндополифосфатазная активность Ppn2 была слабо чувствительна даже к его концентрации 0,25 мг/мл [45]. Что касается экзополифосфатазных активностей,  $I_{50}$  для гепарина составили 0,001 мг/мл и 0,05 мг/мл для Ppn1 и Ppx1, соответственно [45]. Экзополифосфатазные активности Ppn2 и Ddp1 подавлялись не более чем на 13–20% при концентрации гепарина 0,25 мг/мл [45]. В отличие от других полифосфатаз, Ddp1 ингибируется 1 мкМ фторида [43].

Отмечен активирующий эффект ADP на эндополифосфатазные активности Ppn1 [52] и Ppn2 [53]. Аргинин при концентрации 100 мМ активировал эндополифосфатазную активность Ppn1 [53].

Итак, по совокупности свойств, таких как механизм гидролиза полиР, способность к гидролизу низкомолекулярных субстратов разной структуры, стимулирующий эффект двухвалентных катионов и чувствительность к гепарину, четыре полифосфатазы клеток *S. cerevisiae* значительно различаются, что свидетельствует в пользу специфических функций каждой из них в клетке.

#### ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОЛИФОСФАТАЗ

Идея о том, что полиР в клетках дрожжей имеют множественную локализацию, была высказана еще в первой монографии И.С.Кулаева [4, 5]. Она нашла подтверждение при анализе содержания и длины цепи полиР в очищенных фракциях вакуолей, ядер, митохондрий и цитоплазмы, когда было установлено, что эти субклеточные компартменты содержат свои отдельные пулы полиР, различающиеся от других компартментов по длине цепи, влиянию условий культивирования и нокаут-мутаций по генам *PPX1* и *PPN1* [60]. Очевидно, что органеллы и компартменты, содержащие полиР, должны быть снабжены ферментами их метаболизма. Действительно, для *S. cerevisiae* ферменты с экзополифосфатазной активностью были очищены и охарактеризованы из клеточной оболочки [39], цитоплазмы [49], вакуолей [61], митохондрий [62, 63] и ядер [64], а ферменты с эндополифосфатазной активностью из цитоплазмы [43, 65] и вакуолей [44]. Анализ влияния нокаут-мутаций по генам *PPX1*, *PPN1* [60] и *PPN2* [44] на полифосфатазные активности в субклеточных фракциях позволил определить, какие из этих генов ответственны за полифосфатазные активности органелл и компартментов. Так, у мутанта *Dppx1* по сравнению с родительским штаммом экзополифосфатазные активности во фракциях ядер, вакуолей и митохондриальных мембран не изменились, экстракт из клеточной оболочки не содержал полифосфатазы, а в цитоплазме и матриксе митохондрий взамен 45 кД фермента обнаружился высо-

комолекулярный агрегированный фермент, сходный по свойствам с продуктом гена *PPN1* [60, 66–69]. У мутанта по  $\Delta ppn1$  исчезала полифосфатазная активность митохондриальной мембраны и резко снижалась эта активность в вакуолях и ядрах [60]. Эти данные в совокупности со сравнительным анализом свойств полифосфатаз, очищенных из отдельных субклеточных фракций, свидетельствуют о том, что полифосфатаза Ppx1 локализована в цитоплазме, клеточной оболочке и матриксе митохондрий, а Ppn1 – в вакуолях, ядрах и митохондриальных мембранах. Фермент Ddp1 в основном локализован в цитоплазме [43], и в меньшем количестве в ядрах [56]. Ppn2 и Ppn1, локализованные в вакуолях, способны формировать комплекс [44].

Изменения в локализации полифосфатаз возникают не только в случае нокаут-мутации *Δppx1*, но и в некоторых специальных условиях культивирования. Так, при переносе клеток *S. cerevisiae*, голодавших по фосфату, на полноценную среду, в цитоплазме и матриксе митохондрий снижается активность Ppx1 и появляется фермент Ppn1 [68, 69]. Причины такой взаимосвязи между Ppx1 и Ppn1 не выяснены, возможно к этому явлению причастны сигнальные молекулы, которые гидролизуют оба этих фермента, например, нуклеозид тетрафосфаты.

На рис. 3 показана схема локализации известных ферментов метаболизма полиР в клетках дикого типа *S. cerevisiae* при росте на среде, полноценной по фосфату.

#### ВЛИЯНИЕ НОКАУТ-МУТАЦИЙ ПО ГЕНАМ ПОЛИФОСФАТАЗ НА МЕТАБОЛИЗМ ПОЛИР И ДРУГИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ФУНКЦИИ

В первой работе, посвященной идентификации и функциям полифосфатазы Ppn1, было установлено, что мутации в гене *PPN1*, приводящие к отсутствию этой полифосфатазы в клетках *S. cerevisiae* вызывают увеличение содержания полиР и их длины цепи [41]. При более детальном анализе содержания различных фракций полиР у мутанта *Δppn1* было показано, что на стационарной стадии роста происходило двухкратное увеличение содержания наиболее короткоцепочечной фракции полиР 1, а содержание других фракций мало изменялось [70]. Анализ содержания и длины цепи полиР в изолированных субклеточных фракциях показал, что у мутанта *Δppn1* наблюдается увеличение содержания полиР у мутанта *Δppn1* в митохондриях и вакуолях, а увеличение длины цепи – в митохондриях, вакуолях и цитоплазме [60].

Сообщалось также, что у мутантов *Δppn1*, *Δppn2* и *Δppn1Δppn2* содержание полиР не менялось по сравнению с родительским штам-

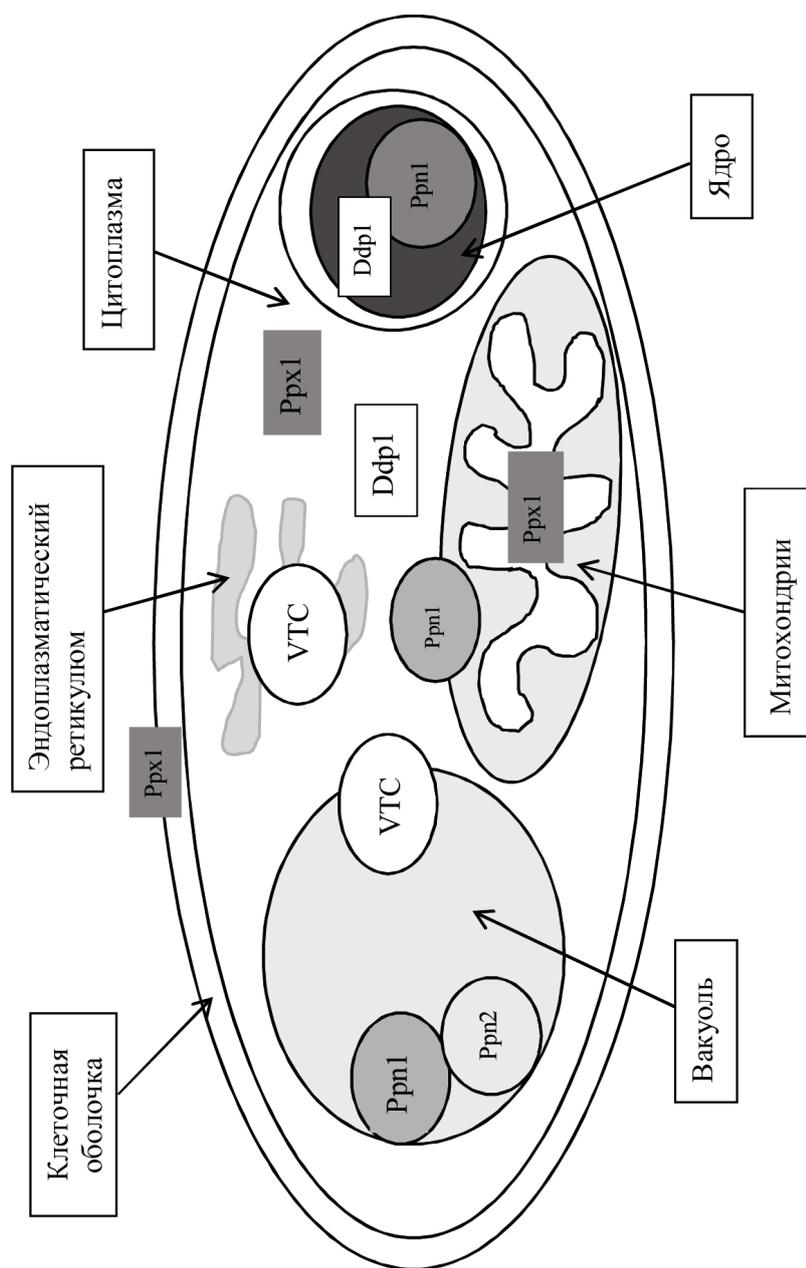


Рис. 3. Локализация ферментов полифосфатного обмена в клетках дрожжей.

мом в клетках, находящихся на лаг-фазе, логарифмической и стационарной логарифмической фазах роста [44]. Эти мутации приводили к увеличению длины цепи полиР, причем эффект был более выражен на стационарной стадии для мутанта *Δppn1* и на логарифмической стадии для мутанта *Δppn2* [44]. Увеличение длины цепи полиР у мутантов *Δppn1* показано рядом исследователей, которые использовали разные генетические конструкции для получения этих штаммов [43, 44, 57].

У нокаут-мутанта *Δppx1* наблюдали незначительное (на ~15%) увеличение содержания наиболее короткоцепочечной фракции полиР 1, а содержание других фракций полиР не изменялось [70]. Изменений длины цепи полиР в отдельных субклеточных фракциях у такого мутанта не наблюдали [60]. У нокаут-мутанта *Δddp1* содержание полиР в клетках даже снизилось (на ~20%) по сравнению с родительским штаммом, хотя содержание инозитол пирофосфата увеличилось более, чем в 2 раза; а длина цепи полиР не изменилась [43].

Анализ различных сочетаний нокаут-мутаций по генам четырех дрожжевых полифосфатаз на длину цепи полиР, экстрагируемой из клеток с помощью обработки фенолом и солями лития, показал, что наибольший вклад в увеличение длины цепи полиР вносит нокаут-мутация по гену *PPN1*, у двойного мутанта *Δppn1Δppn2* увеличение длины цепи полиР еще более выражено, а добавление мутаций *Δppx1* и *Δddp1* как вместе, так и по отдельности уже не влияло на длину цепи полиР [57].

Изучение особенностей содержания и длины цепи полиР у нокаут-мутантов по генам полифосфатаз приводит к выводу о том, что основной вклад в регуляцию содержания и длины полиР в клетках *S. cerevisiae* вносят полифосфатазы Ppn1 и Ppn2.

Рассмотрим теперь, какие еще клеточные функции подвергаются изменениям при нокаут-мутациях по генам полифосфатаз. Отметим, что мутант *Δppn1Δppn2Δppx1Δddp1* является жизнеспособным [57] и найти условия, при которых мутанты по генам полифосфатаз проявляют дефекты роста, является непростой задачей. Такие условия найдены для мутантов, не экспрессирующих полифосфатазу Ppn1. У мутанта *Δppn1* отмечено снижение выживаемости в стационарной стадии роста [41]. Это снижение было объяснено тем, что мутантный штамм *Δppn1* не способен к потреблению этанола и других окисляемых субстратов [67]. В митохондриях родительского штамма содержание кислоторастворимых полиР уменьшалось от ~1 мкмоль Р на 1 мг белка на логарифмической стадии роста до 0,3 мкмоль Р на 1 мг белка на стационарной стадии роста. У мутантов *Δppn1* содержание полиР возрастало от 0,3 мкмоль на 1 мг белка на логарифмической

стадии роста до 0,72 мкмоль Р на 1 мг белка на стационарной стадии роста. Длина цепи полиР в митохондриях у штаммов с сохраненной функций гена *PPN1* уменьшалась при переходе к стационарной стадии роста, а у мутантов по этому гену – возрастала. На стадии роста, когда должны формироваться функционально активные митохондрии, промитохондрии мутанта *Δppn1* содержали полиР со средней длиной цепи 80–130 фосфатных остатков, а не короткоцепочечные полиР (~15 фосфатных остатков), характерные для контрольных штаммов [67]. Таким образом, полифосфатаза Ppn1, одним из мест локализации которой является мембранная фракция митохондрий, играет важную роль в развитии митохондрий при переходе от состояния катаболитной репрессии к росту на окисляемых субстратах.

Содержание полиР в клетках дрожжей закономерно осциллирует в ходе клеточного цикла. При вступлении в S-фазу содержание полиР уменьшается, восстанавливаясь до прежнего уровня на стадии митоза. При этом, несмотря на изменение содержания полиР, концентрация цитоплазматического фосфата остается постоянной, на уровне 20 мМ [71]. Какова же тогда роль циклического изменения содержания полиР и какие системы отвечают за гомеостаза фосфата в ходе клеточного цикла? Использование мутантов по генам биосинтеза и деградации полиР оказалось крайне полезным для ответа на эти вопросы. Прогрессия клеточного цикла была нарушена у штаммов, дефектных по синтезу полиР (*Δvtc4*) и его мобилизации (*Δppn1Δppx1*) [71]. У обоих мутантов при культивировании на среде, лимитированной по фосфату, более чем в 2 раза увеличивалось время удвоения ДНК [71]. Этот эффект, а также наблюдаемая у мутантов увеличенная нестабильность генома, очевидно связаны со снижением у них уровня dNTP [71].

Совокупность полученных данных позволила авторам обосновать важную роль полиР как источника фосфата для синтеза dNTP в условиях лимита по фосфату [71]. Поскольку полиР выполняют множественные функции, можно ожидать обнаружения и других случаев влияния нокаут-мутаций в генах полифосфатаз на способность клеток преодолевать неблагоприятные условия среды.

#### СВЕРХЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПОЛИФОСФАТАЗ

Изучение физиологических особенностей нокаут-мутантов является классическим подходом для выяснения функций отдельных белков. В случае полифосфатаз дрожжей этот подход оказывается недостаточным из-за плейотропного действия таких мутаций и отсутствия в ряде случаев значимого изменения в уровне полиР. Другим подходом является конструирование штаммов, сверхэкспрессирующих

отдельные полифосфатазы. Отметим, что клонирование генов дрожжевых полифосфатаз в клетках бактерий не всегда целесообразно, в частности, для получения зрелой активной формы Ppn1 требуется присутствие специфической протеиназы [41]. Конструирование штаммов *S. cerevisiae*, сверхпродуцирующих полифосфатазы, позволяет решать две задачи: получение чистых препаратов полифосфатаз из бесклеточных экстрактов с заведомо большей активностью, чем у дикого штамма, и изучение влияния такой сверхэкспрессии на метаболизм полиР и другие клеточные функции. Отметим, что использование диких штаммов дрожжей для такого конструирования оказалось неэффективным, поскольку полученные штаммы имели сниженную жизнеспособность, по крайней мере в случае гена *PPN1*. Мутантный штамм по гену *PPN1* оказался более удобным реципиентом, полученные нами штаммы, сверхэкспрессирующие все четыре полифосфатазы по отдельности, не отличались по жизнеспособности от исходного штамма. Экспрессия генов полифосфатаз в клетках дрожжей осуществлялась под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *S. cerevisiae* (*TDH3*) в составе специализированного вектора pMB1 [53, 72–74]. Вектор pMB1 является низкокопийным и сегрегационно-стабильным, обеспечивая в то же время существенное повышение уровня продукции исследованных полифосфатаз в трансформантах по сравнению со штаммами дикого типа. Жизнеспособность таких штаммов практически не отличалась от жизнеспособности штаммов дикого типа, что позволило провести сравнительное изучение физиологии всех полученных штаммов в одних и тех же условиях, а также получить все четыре полифосфатазы с хорошей степенью очистки из бесклеточного экстракта с помощью стандартных хроматографических процедур [45]. У штаммов-трансформантов существенно увеличивались полифосфатазные активности в бесклеточном экстракте, в случае экзополифосфатаз это увеличение было оценено количественно – удельная активность возрастала в 10–20 раз в зависимости от использованных условий культивирования [72, 73]. В таблице 3 показано, как сверхэкспрессия полифосфатаз повлияла на содержание в клетке относительно низкополимерных (со средней длиной цепи около 15 фосфатных остатков) кислоторастворимых полиР и более высокополимерных (от 25 до 200 фосфатных остатков) кислотонерастворимых полиР. У штаммов, сверхэкспрессирующих Ppx1 и Ddp1, изменения в содержании полиР невелики, что согласуется с тем, что и мутации по соответствующим генам не оказывали существенного влияния на

Таблица 3. Содержание полиР в клетках штаммов *S. cerevisiae*, сверхпродуцирующих полифосфатазы (% от содержания полиР в клетках родительского штамма). Клетки выращены на селективной среде YNB до стационарной стадии роста. Результаты суммированы из работ [53, 72–74]

Сверхпродуцирующая полифосфатаза	Кислоторастворимые полиР	Кислотонерастворимые полиР
Родительский штамм	100	100
Rpn1	18	40
Rpx1	99	71
Ddp1	90	83
Rpn2	280	62

содержание полиР. Наибольшие изменения отмечены у сверхпродуцентов Rpn1 и Rpn2. Эти изменения неодинаковы: сверхэкспрессия Rpn1 приводит в первую очередь к снижению содержания короткоцепочечных полиР, а сверхэкспрессия Rpn2 приводит к увеличению содержания короткоцепочечных полиР, а снижается содержание только длинноцепочечных полиР. Отметим, что в обоих случаях сверхэкспрессируемые ферменты в большом количестве появляются в цитоплазме, в растворимой форме [53, 72–74], тогда как основное их место локализации у штаммов дикого типа – это вакуоли или также другие органеллы в случае Rpn1. В результате низкополимерные полиР цитоплазмы оказываются доступны для воздействия Rpn1 как экзополифосфатазы и Rpn2 как эндополифосфатазы. Увеличение содержания в цитоплазме Rpx1 и Ddp1 не оказывало значимого воздействия на эти низкополимерные полиР [73, 74]. Следует учесть, что эти два фермента у штаммов дикого типа локализованы в основном в цитоплазме, следовательно, полиР этого компартмента каким-то образом защищены от их воздействия.

Сверхэкспрессия полифосфатаз Rpn1 и Rpn2 оказала хорошо выраженное влияние на физиологию клеток *S. cerevisiae*. У штамма, сверхэкспрессирующего Rpn1, наблюдалась повышенная экспрессия больших групп генов, связанных с ответом на внешние стимулы, организацией цитоплазматической мембраны и окислительно-восстановительными реакциями [75]. Соответственно, увеличилась устойчивость этого штамма к окислительному и марганцевому стрессам [75]. Штамм, сверхпродуцирующий Rpn2, оказался более устой-

чивым к воздействию щелочи и перекиси [53]. Мы предполагаем, что короткоцепочечные полиР могут служить сигнальными молекулами, а также участвовать в поддержании гомеостаза рН в цитоплазме, поэтому значительное снижение или увеличение их уровня воздействует на адаптивный потенциал клеток дрожжей. Полученные данные показывают, что штаммы-сверхпродуценты полифосфатаз являются хорошей моделью для изучения роли отдельных фракций полиР в адаптации клеток дрожжей к различным видам стресса.

#### IV. ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИФОСФАТАЗ

Количественное определение полиР в крови и других биологических образцах человека является назревшей задачей, решение которой важно для мониторинга состояния пациентов, страдающих заболеваниями сердечно-сосудистой системы, в особенности при риске увеличенного тромбообразования, некоторыми видами нарушений свертываемости крови, остеопорозом и остеохондрозом. Необходимость контроля количества полиР в пищевых продуктах, природных водах и почвах связана с тем, что эти полимеры используются в качестве умягчителей воды, удобрений разрешенных пищевых добавок в составе кондитерских изделий, замороженной рыбы, морепродуктов, мясных и колбасных изделий, продукции хлебопечкарной промышленности. Известно, что полиР способны всасываться в кишечнике человека [76]. Организм человека в развитых странах получает увеличенное по сравнению с прошлым количество минерального фосфора, однако вопрос о том, как это влияет на состояние здоровья, малоизучен.

На сегодня наиболее высокоспецифичными и чувствительными методами определения полиР являются метод определения флуоресценции комплексов полиР с ДАПИ и энзиматический метод с использованием специфических ферментов [77]. Полифосфатазы дрожжей на два порядка более активны, чем полифосфатазы бактерий [78], что является преимуществом при использовании их в качестве аналитических реагентов. Для определения полиР пригодны ферменты Ppx1 и Ppn1, которые обладают следующими качествами: высокоспецифичны по отношению к полиР и хорошо хранятся при замораживании в среде, содержащей тритон X-100 (свыше двух лет без потери активности согласно нашим наблюдениям). Эти два фермента различаются по субстратной специфичности: Ppx1 более активна с короткоцепочечными полиР, включая триполифосфат, а Ppn1 –

с длинноцепочечными полиР, что дает дополнительные возможности оценки преобладания полимеров с разной длиной цепи в исследуемых образцах. Выход ферментов при использовании штаммов-супер-продуцентов и разработанных нами методик очистки достаточно высок: из 1 г биомассы дрожжей можно получить количество фермента, достаточного для 200 анализов [79]. Методика определения относительно проста: пробу инкубируют при рН 7 с добавлением ионов магния или кобальта и аликвоты фермента, после чего прирост содержания фосфата определяют с помощью стандартных колориметрических методов, которые имеют чувствительность в наномолярной области [79]. Применение Ppx1 для определения полиР в биологических объектах хорошо описано в литературе [79–82]. Что касается эндополифосфатаз, то они представляют интерес для получения полиР с заданной средней длиной цепи из коммерческих высокомолекулярных полифосфатов. Варьируя условия обработки, можно получить продукт с длиной цепи около 60 фосфатных остатков [52]. Именно такие полиР присутствуют у млекопитающих и необходимы для изучения влияния на различные биологические процессы [10,11].

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дрожжи обладают многокомпонентной системой метаболизма полиР, включающей белки VTC комплекса и четыре полифосфатазы, относящиеся к различным белковым семействам и различающиеся по свойствам, локализации в клетках и функциям. Основную роль в метаболизме полиР в клетках дикого типа играют Ppn1 и Ppn2. Роль Ddp1 в основном состоит в контроле уровня вторичных сигнальных молекул, инозитол пирофосфата и аденозин-полифосфатов, а функции Ppx1 требуют дальнейших исследований. Все полифосфатазы в той или иной мере способны гидролизовать вторичные сигнальные молекулы со сложноэфирной связью, а Ppx1 и Ppn1 способны отщеплять полиР от лизин-полифосфорилированных белков, тем самым регулируя их активность. Эти свойства полифосфатаз свидетельствуют о том, что они участвуют в вовлечении полиР в самые разнообразные регуляторные процессы в дрожжевой клетке, включая регуляцию клеточного цикла и адаптацию к стрессам. Дальнейшие исследования функциональной роли этих ферментов имеет важное значение также и в связи с наличием близких по структуре белков в клетках млекопитающих.

Экзополифосфатазы дрожжей являются перспективным аналитическим реагентом для высокоспецифичного и чувствительного анализа полиР и получения полиР заданной длины для исследовательских целей и разработки лекарственных средств.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Белозерский А.Н., Кулаев И.С. (1957) Полифосфаты и их значение для процессов развития *Aspergillus niger*, *Биохимия*, **22**, 29–39.
2. Кулаев И.С., Белозерский А.Н. (1962) Конденсированные неорганические фосфаты в обмене веществ живых организмов. Ч. I, *Известия АН СССР*, **3**, 354–368.
3. Кулаев И.С., Белозерский А.Н. (1962) Конденсированные неорганические фосфаты в обмене веществ живых организмов. Ч. II, *Известия АН СССР*, **3**, 502–521.
4. Кулаев И.С. (1975) Биохимия неорганических полифосфатов. М: Изд. МГУ. 246 с.
5. Kulaev I.S. (1979) *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*. Chichester: John Willey & Sons. 255 p.
6. Rao, N.N., Gómez-García, M.R., Kornberg, A. (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival, *Annual Review of Biochemistry*, **78**, 605–647.
7. Clotet, J. (2017) Polyphosphate: popping up from oblivion, *Current Genetics*, **63**, 15–18.
8. Omelon, S., Georgiou, J., Henne-man, Z.J., Wise, L.M., Sukhu, B., Hant, T., Wynnyckyj, S., Holmyard, D., Bielecki, R., Grynypas, M.D. (2009) Control of vertebrate skeletal mineralization by polyphosphates, *PLoS ONE*, **4**(5), e5634.
9. Müller, W.E., Wang, X., Schröder, H.C. (2017) New target sites for treatment of osteoporosis, *Progress Molecular Subcellular Biology*, **55**, 187–219.
10. Ruiz, F.A., Lea, C.R., Oldfield, E., Docampo, R. (2004) Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes, *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 44250–44257.
11. Smith, S.A., Morrissey, J.H. (2008) Polyphosphate as a general procoagulant agent, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **6**, 1750–1756.
12. Baker, C.J., Smith S.A., Morrissey, J.H. (2019) Polyphosphate in thrombosis, hemostasis, and inflammation, *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, **3**, 18–25.

---

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

13. Holmstrom, K.M., Marina, N., Baev, A.Y., Wood, N.W., Gourine, A.V., Abramov, A.Y. (2013) Signaling properties of inorganic polyphosphate in the mammalian brain, *Nature Communication*, **4**, 1362. doi: 10.1038/ncomms2364.
14. Angelova, P.R., Iversen, K.Z., Teschemacher, A.G., Kasparov, S., Gourine, A.V., Abramov, A.Y. (2018) Signal transduction in astrocytes: Localization and release of inorganic polyphosphate, *Glia*, **66**, 2126–2136.
15. Lempart, J., Jakob, U. (2019) Role of polyphosphate in amyloidogenic processes, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **11**(5), pii: a034041, doi: 10.1101/cshperspect.a034041.
16. Seidlmayer, L.K., Juettner, V.V., Kettlewell, S., Pavlov, E.V., Blatter, L.A., Dedkova, E.N. (2015) Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca<sup>2+</sup>, ROS, pH, and inorganic polyphosphate, *Cardiovascular Research*, **106**, 237–248.
17. Baev, A.Y., Negoda, A., Abramov, A.Y. (2017) Modulation of mitochondrial ion transport by inorganic polyphosphate – essential role in mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **49**, 49–55.
18. Pilliar, R.M., Kandel, R.A., Grynbas, M.D., Theodoropoulos, J., Hu, Y., Allo, B., Changoor, A. (2017) Calcium polyphosphate particulates for bone void filler applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **105**(4), 874–884.
19. Müller, W.E.G., Wang, S., Tolba, E., Neufurth, M., Ackermann, M., Muñoz-Espí, R., Lieberwirth, I., Glasser, G., Schröder, H.C., Wang, X. (2018) Transformation of amorphous polyphosphate nanoparticles into coacervate complexes: an approach for the encapsulation of mesenchymal stem cells, *Small*, **14**(27):e1801170, doi: 10.1002/smll.201801170.
20. Wang, Y., Li, M., Li, P., Teng, H., Fan, D., Du, W., Guo, Z. (2019) Progress and applications of polyphosphate in bone and cartilage regeneration, *Biomedical Research International*, **27**, 5141204. doi: 10.1155/2019/5141204. eCollection 2019.
21. Kalathottukaren, M.T., Abraham, L., Kapopara, P., Lai, B.F., Sheno, R.A., Rosell, F., Conway, E.M., Pryzdial, E.L., Morrissey, J.H., Haynes, Kizhakkedathu, J.N. (2017) Alteration of blood clotting and lung damage by protamine are avoided using the heparin and polyphosphate inhibitor UHRA, *Blood*, **129**(10), 1368–1379.
22. Pestov, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S. (2004) Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess, *FEMS Yeast Research*, **4**(6), 643–648.
23. Tammenkoski, M., Koivula, K., Cusanelli, E., Zollo, M., Steegborn, C., Baykov, A.A., Lahti, R. (2008) Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase, *Biochemistry*, **47**, 9707–9713.
24. McGrath, J.W., Kulakova, A.N., Kulakov, L.A., Quinn, J.P. (2005) In vitro detection and characterization of a polyphosphate synthesising activity in the yeast *Candida humicola* G-1, *Research in Microbiology*, **156**, 485–491.
25. Hooley, P., Whitenhead, M.P., Brown, M.R. (2008) Eucaryote polyphosphate kinases: is the «Kornberg» complex ubiquitous? *Trends in Biochemical Sciences*, **33**, 577–582.
26. Whitehead, M.P., Hooley, P.W., Brown, M.R. (2013) Horizontal transfer of bacterial polyphosphate kinases to eukaryotes: implications for

- the ice age and land colonization, *BMC Research Notes*, **6**, 221, doi: 10.1186/1756-0500-6-221.
27. Шабалин Ю.А., Вагабов В.М., Циоменко А.Б., Землянухина О.А., Кулаев И.С. (1977) Изучение полифосфаткиназной активности в вакуолях дрожжей. *Биохимия*, **42**, 1642–1648.
28. Boyce, K. J., Kretschmer, M., Kronstad, J.W. (2006) The *vtc4* gene influences polyphosphate storage, morphogenesis, and virulence in the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eucaryotic Cell*, **5**, 1399–1409.
29. Ogawa, N., DeRisi, J., Brown, P.O. (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis, *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 4309–4321.
30. Muller, O., Bayer, M.J., Peters, C., Andersen, J.S., Mann, M. and Mayer, A. (2002) The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V(0) trans-complex formation, *EMBO Journal*, **21**, 259–269.
31. Muller, O., Neumann, H., Bayer, M.J., Mayer, A. (2003) Role of Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking, *Journal of Cell Science*, **116**, 1107–1115.
32. Hothorn, M., Neumann, H., Lenherr, E.D., Wehner, M., Rybin, V., Hassa, P.O., Uttenweiler, A., Reinhardt, M., Schmidt, A., Seiler, J., Ladurner, A.G., Herrmann, C., Scheffzek, K., Mayer, A. (2009) Catalytic core of a membrane-associated eucaryotic polyphosphate polymerase, *Science*, **324**, 513–516.
33. Gerasimaitė, R., Mayer, A. (2016) Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles, *Biochemical Society Transactions*, **44**(1), 234–239.
34. Wild, R., Gerasimaite, R., Jung, J.Y., Truffault, V., Pavlovic, I., Schmidt, A., Saiardi, A., Jessen, H.J., Poirier, Y., Hothorn, M., Mayer, A. (2016) Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains, *Science*, **352**(6288), 986–990.
35. Gerasimaite, R., Pavlovic, I., Capolicchio, S., Hofer, A., Schmidt, A., Jessen, H.J., Mayer, A. (2017) Inositol pyrophosphate specificity of the SPX-dependent polyphosphate polymerase VTC, *ACS Chemical Biology*, **12**(3), 648–653.
36. Desfougères, Y., Gerasimaitė, R.U., Jessen, H.J., Mayer, A. (2016) Vtc5, a novel subunit of the vacuolar transporter chaperone complex, regulates polyphosphate synthesis and phosphate homeostasis in yeast, *Journal of Biological Chemistry*, **291**(42), 22262–22275.
37. Шабалин Ю.А., Кулаев И.С. (1989) Солнобилизация и свойства долинхидифосфат: полифосфатфосфотрансферазы дрожжей, *Биохимия*, **54**, 68–75.
38. Кулаев И.С. Шимона О. Бобык М.А. (1968) О биосинтезе неорганических полифосфатов у *Neurospora crassa*, *Биохимия*, **33**, 419–443.
39. Andreeva, N.A., Okorokov, L.A. (1993) Purification and characterization of highly active and stable polyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cell envelope, *Yeast*, **9**, 127–139.
40. Wurst, H., Shiba, T., Kornberg, A. (1995) The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bacteriology*, **177**, 898–906.
41. Sethuraman, A., Rao, N.N., Kornberg, A. (2001) The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 8542–8547.
42. Андреева Н.А., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (2006) Высокомолекулярная экзополифосфатаза цитозоля *Saccharomyces cerevisiae* кодируется геном PPN1. *Биохимия*, **71**, 1198–1201.
  43. Lonetti, A., Szijgyarto, Z., Bosch, D. Loss, O., Azevedo, C., Saiardi, A. (2011) Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases, *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 31966–31974.
  44. Gerasimait, R., Mayer, A. (2017) Ppn2, a novel Zn<sup>2+</sup>-dependent polyphosphatase in the acidocalcisome-like yeast vacuole, *Journal of Cell Science*, **130**, 1625–1636.
  45. Andreeva, N., Ledova, L., Ryazanova, L., Tomashevsky, A., Kulakovskaya, T., Eldarov, M. (2019) Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases, *Biochimie*, **163**, 101–107.
  46. Kizawa, K., Aono, T., Ohtomo, R. (2017) PHO8 gene coding alkaline phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in polyphosphate metabolism, *Journal of General and Apply Microbiology*, **62**(6), 297–302.
  47. Ugochukwu, E., Lovering, A.L., Mather, O.C., Young, T.W., White, S.A. (2007) The crystal structure of the cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the basis for substrate specificity, *Journal of Molecular Biology*, **371**, 1007–1021
  48. Shi, X., Kornberg, A. (2005) Endopolyphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* undergoes post-translational activations to produce short-chain polyphosphates, *FEBS Letters*, **579**, 2014–2018.
  49. Андреева Н.А., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (2004) Очистка и свойства экзополифосфатазы цитозоля *Saccharomyces cerevisiae*, не кодируемой геном PPN1. *Биохимия*, **69**, 480–487.
  50. Andreeva, N., Lichko, L., Trilisenko, L., Kulakovskiy, I.V., Kulakovskaya, T. (2016) Yeast polyphosphatases PPN1 and PPN2: properties, functions, and localization, *Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells*, Eds. T. Kulakovskaya, E. Pavlov, E. N. Dedkova (Eds.), Springer, Cham, 15–33.
  51. Андреева Н.А., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (1996) Очистка и характеристика полифосфатазы из цитозоля *S. cerevisiae*. *Биохимия*, **61**, 1714–1724.
  52. Andreeva, N., Trilisenko, L., Eldarov, M., Kulakovskaya, T. (2015) Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces cerevisiae*: switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities, *PLoS One*, **10** (3), e0119594, doi:10.1371/journal.pone.0119594.
  53. Рязанова Л.П., Ледова Л.А., Андреева Н.А., Звонарев А.Н., Эльдаров М.А., Кулаковская Т.В. (2020) Неорганические полифосфаты и особенности физиологии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при сверхэкспрессии гена PPN2, *Биохимия*, **83**, 598–606.
  54. Кулаковская Т.В., Андреева Н.А., Кулаев И.С. (1997) Аденозин-5'-тетрафосфат и гуанозин-5'-тетрафосфат – новые субстраты экзополифосфатазы цитозоля дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *Биохимия*, **62**, 1225–1227.
  55. Guranowski, A., Starzynska, E., Barnes, L.D., Robinson, A.K., Liu,

- S. (1998) Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase activity is an inherent property of soluble exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1380**, 232–238.
56. Azevedo, C., Livermore, T., Saiardi, A. (2015) Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate, *Molecular Cell*, **58**(1), 71–82.
57. Azevedo, C., Desfougères, Y., Jiramongkol, Y., Partington, H., Trakan-suebkul, S., Singh, J., Steck, N., Jessen, H.J., Saiardi, A. (2020) Development of a yeast model to study the contribution of vacuolar polyphosphate metabolism to lysine polyphosphorylation, *Journal of Biological Chemistry*, **295**(6), 1439–1451.
58. Кулаковская Т.В., Андреева Н.А., Карпов А.В., Сидоров И.А., Кулаев И.С. (1999) Гидролиз триполифосфата очищенной экзополифосфатазой цитозоля дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: кинетические характеристики. *Биохимия*, **64**, 1180–1184.
59. Tammenkoski, M., Moiseev, V.M., Lahti, M., Ugochukwu, E., Brondijk, T., HC, S. White, S.A., Lahti, R., Baykov, A.A. (2007) Kinetic and mutational analyses of the major cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 9302–9311.
60. Lichko, L., Kulakovskaya, T., Pestov, N., Kulaev I. (2006) Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of PPX1 and PPN1 genes, *Bioscience Reports*, **26**, 45–54.
61. Andreeva, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S. (1998) Purification and properties of exopolyphosphatase isolated from *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles, *FEBS Letters*, **429**, 194–196.
62. Lichko, L.P., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S. (1998) Membrane-bound and soluble polyphosphatases of mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and comparative characterization, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1372**, 153–162.
63. Личко Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (2000) Очистка и характеристика растворимой полифосфатазы из митохондрий *Saccharomyces cerevisiae*. *Биохимия*, **65**, 421–427.
64. Личко, Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (2004) Частичная очистка и характеристика экзополифосфатазы ядер штамма *Saccharomyces cerevisiae* с инактивированным геном PPX1, кодирующим основную экзополифосфатазу дрожжей. *Биохимия*, **69**, 338–343.
65. Личко Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. (2010) Свойства частично очищенной эндополифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *Биохимия*, **75**, 1596–1600.
66. Lichko, L., Kulakovskaya, T., Kulaev, I. (2004) Inactivation of endopolyphosphatase gene PPN1 results in inhibition of expression of exopolyphosphatase PPX1 and high-molecular-mass exopolyphosphatase not encoded by PPX1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1674**, 98–102.
67. Pestov, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S. (2005) Effects of inactivation of the PPN1 gene on exopolyphosphatases, inorganic polyphosphates and function of mitochondria in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research*, **5**, 823–828.
68. Kulakovskaya, T.V., Andreeva, N.A., Trilisenko, L.V., Vagabov, V.M., Kulaev, I.S. (2004) Two exo-

- polyphosphatases in *Saccharomyces cerevisiae* cytosol at different culture conditions, *Process Biochemistry*, **39**, 1625–1630.
69. Андреева Н.А., Кулаковская Т.В., Кулаковская Е.В., Кулаев И.С. (2008) Полифосфаты и экзополифосфатазы в цитозоле и митохондриях *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании на глюкозе и этаноле в условиях гиперкомпенсации по фосфату. *Биохимия*, **73**, 80–85.
70. Кулаковская Т.В., Трилисенко Л.В., Личко Л.П., Вагабов В.М., Кулаев И.С. (2006) Влияние инактивации генов экзополифосфатазы *PPX1* и *PPN1* на содержание полифосфатов различных фракций у *Saccharomyces cerevisiae*, *Микробиология*, **75**, 35–39.
71. Bru, S., Martínez-Láinez, J.M., Hernández-Ortega, S., Quandt, E., Torres-Torronteras, J., Martí, R., Canadell, D., Ariño, J., Sharma, S., Jiménez, J., Clotet, J. (2016) Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Microbiology*, **101**(3), 367–380.
72. 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.
73. Личко Л.П., Эльдаров М.А., Думина М.В., Кулаковская Т.В. (2014) Сверхэкспрессия гена *PPX1* не влияет на полифосфаты *Saccharomyces cerevisiae*. *Биохимия*, **79**, 1487–1492.
74. Трилисенко Л.В., Андреева Н.А., Эльдаров М.А., Думина М.В., Кулаковская Т.В. (2015) Полифосфаты и полифосфатазная активность *Saccharomyces cerevisiae* при сверхэкспрессии *DDP1*. *Биохимия*, **80**, 1588–1594.
75. Trilisenko L., Zvonarev A., Valiakmetov A., Penin A.A., Eliseeva I.A., Ostroumov V., Kulakovskiy I.V., Kulakovskaya T. (2019) The reduced level of inorganic polyphosphate mobilizes antioxidant and manganese-resistance systems in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cells*, **8**(5), pii: E461, doi: 10.3390/cells8050461.
76. Segawa, S., Fujiya, M., Konishi, H., Ueno, N., Kobayashi, N., Shigyo, T., Kohgo, Y. (2011) Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway, *PLoS One*, **6**(8), e23278, doi:10.1371/journal.pone.0023278.
77. Solesio, M.E., Pavlov, E.V. (2016) Methods of Inorganic Polyphosphate (PolyP) Assay in Higher Eukaryotic Cells. *Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells*, Eds. T. Kulakovskaya, E. Pavlov, E.N. Dedkova (Eds.), Springer, Cham, 81–89.
78. Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A. (1993) An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon, *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 633–639.
79. Lichko, L., Kulakovskaya, T. (2015) Polyphosphatase *PPX1* of *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for polyphosphate assay, *Advances in Enzyme Research*, **3**, Paper ID 61624, doi:10.4236/aer.2015.34010 3.
80. Ohtomo, R., Sekiguchi, Y., Kojima, T., Saito, M. (2008) Different chain length specificity among three polyphosphate quantification methods, *Analytical Biochemistry*, **383**, 210–216.

- 
81. Zvonarev, A.N., Crowley, D.E., Ryzanov, L.P., Lichko, L.P., Rusakova, T.G., Kulakovskaya, T.V., Dmitriev, V.V. (2017) Cell wall canals formed upon growth of *Candida maltosa* in the presence of hexadecane are associated with polyphosphates, *FEMS Yeast Research*, **17**, fox026
82. Christ, J.J., Blank, L.M. (2018) Enzymatic quantification and length determination of polyphosphate down to a chain length of two, *Analytical Biochemistry*, **548**, 82–90.